



HAL
open science

Caractérisation clinico-pathologique et moléculaire du sarcome sinonasal biphénotypique à partir d'une série de 41 cas

Sophie Laffont

► To cite this version:

Sophie Laffont. Caractérisation clinico-pathologique et moléculaire du sarcome sinonasal biphénotypique à partir d'une série de 41 cas. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02100130

HAL Id: dumas-02100130

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02100130>

Submitted on 15 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Caractérisation clinico-pathologique et moléculaire du
sarcome sinonasal biphénotypique à partir d'une série de
41 cas**

Sophie Laffont

► **To cite this version:**

Sophie Laffont. Caractérisation clinico-pathologique et moléculaire du sarcome sinonasal biphénotypique à partir d'une série de 41 cas. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02100130

HAL Id: dumas-02100130

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02100130>

Submitted on 15 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES MEDICALES

Année 2019

N° 3003

**Thèse pour l'obtention du
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**
Discipline : Anatomie et cytologie Pathologiques

Présentée et soutenue publiquement le 05 février 2019

Par **Sophie LAFFONT**
Née le 16 février 1986 à Paris (75)

**CARACTERISATION CLINICO-PATHOLOGIQUE ET
MOLECULAIRE DU SARCOMA SINONASAL BIPHENOTYPIQUE
A PARTIR D'UNE SERIE DE 41 CAS.**

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Jean-Michel COINDRE, Institut Bergonié

Membres du jury :

Madame le Professeur Brigitte LE BAIL	Présidente
Monsieur le Professeur Jean-Philippe MERLIO	Juge
Monsieur le Professeur Ludovic DE GABORY	Juge
Monsieur le Maître de conférences universitaire François LE LOARER	Juge
Monsieur le Professeur Jean-Michel COINDRE	Juge

Rapporteur externe : Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE

REMERCIEMENTS

A mon rapporteur,

Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE,
Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier,
Université de Toulouse,
Oncopôle, Centre Hospitalo-universitaire de Toulouse,

Chère Madame,

Vous m'honorez beaucoup d'avoir accepté d'être mon rapporteur de thèse. Je vous remercie infiniment du temps précieux que vous avez passé à relire ce travail qui porte sur l'un de vos sujets de prédilection en Anatomopathologie.

Veillez croire, chère Madame, à l'expression de ma très sincère reconnaissance.

A mon juge,

Monsieur le Professeur Luc de Gabory,
Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,
Université de Bordeaux,
Service de Chirurgie O.R.L.
Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalo-universitaire de Bordeaux,

Cher Monsieur,

Je vous remercie très vivement d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et de porter ainsi un regard clinique sur ce travail d'Anatomo-Pathologie.

Je vous prie de croire, cher Monsieur, à l'expression de ma très sincère reconnaissance.

A mon juge,

Monsieur le Docteur François LE LOARER ,
Maître de Conférences universitaire, Praticien Hospitalier
Université de Bordeaux
Service de Bio-Pathologie
Institut Bergonié, Centre Hospitalo-universitaire de Bordeaux

Cher François,

Je te remercie beaucoup d'avoir accepté de juger ce travail qui porte sur un sujet dont je sais qu'il t'intéresse tout particulièrement dans le cadre de tes recherches. Je tiens également à te remercier très sincèrement pour ta disponibilité et pour le temps que tu consacres à la formation et l'encadrement des internes d'Anatomo-Pathologie de Bordeaux.

Je te prie de croire, cher François, à l'expression de ma profonde reconnaissance.

A mon juge,

Monsieur le Professeur Jean-Philippe Merlio,

Professeur des Universités,, Praticien Hospitalier

Université de Bordeaux,

Service de Biologie des Tumeurs

Hôpital Haut-Lévêque, Centre Hospitalo-universitaire de Bordeaux,

Cher Monsieur,

Je suis très honorée que vous ayez accepté d'être membre de mon jury de thèse. Je tiens également à vous dire que je garde un excellent souvenir des quelques mois passés dans votre service et qui m'ont beaucoup appris dans le domaine de la Biologie moléculaire. Je vous en remercie infiniment.

Je tiens à vous exprimer, cher Monsieur, mon profond respect et toute ma gratitude.

A mon directeur et juge,

Monsieur le Professeur Jean-Michel COINDRE

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,

Service de Bio-Pathologie

Institut Bergonié, Centre Hospitalo-universitaire de Bordeaux

Cher Monsieur,

Je tiens à vous exprimer mes très vifs remerciements d'avoir bien voulu me proposer ce sujet de thèse particulièrement intéressant puisqu'il touche à l'Anatomo-Pathologie bien sûr, mais aussi à la Pathologie moléculaire et à une spécialité clinique, l'ORL. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée, pour vos précieux conseils et critiques qui ont permis de faire progresser ce travail, et pour votre disponibilité. J'ai également eu la chance de bénéficier de vos excellents enseignements en Pathologie des Tissus mous lors de mon stage dans votre service. Je vous en remercie infiniment.

Je vous prie de croire, cher Monsieur, à l'expression de mon profond respect et à toute ma gratitude.

A mon président et juge,

Madame le Professeur Brigitte LE BAIL

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,

Université de Bordeaux,

Service d'Anatomo-Pathologie

Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalo-universitaire de Bordeaux,

Chère Brigitte,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de présider mon jury de thèse. Je vous en remercie très sincèrement et j'espère que ce travail vous satisfera. Je tiens également à vous témoigner ma reconnaissance pour vos excellents enseignements en Pathologie hépatique dont j'ai eu la chance de bénéficier au cours des semestres passés dans votre service.

Je vous prie de croire, chère Brigitte, à l'expression de mon profond respect.

Je remercie également le Dr. Isabelle Soubeyran pour son aide précieuse en biologie moléculaire. Je remercie chaleureusement l'ensemble des ingénieurs et techniciens de l'Institut Bergonié, en particulier Mmes Isabelle Hostein, Gaëlle Pérot et Valérie Velasco, sans qui cette étude n'aurait pu être réalisée.

Je tiens également à remercier le Dr. Michel Wassef du CHU Lariboisière à Paris qui a participé à la réalisation de ce travail en nous communiquant une partie des cas de notre série.

Je remercie aussi les médecins pathologistes qui nous ont communiqué les blocs nécessaires à la réalisation d'analyses complémentaires sur les cas de notre série : le Dr. Ayadi Lobna de Sfax (Tunisie), le Dr. Cassagnau et le Dr. Aillet de Nantes, le Pr. Costes du CHU de Montpellier, le Dr. Desrousseau de Biarritz, le Dr. François de Rouen, le Dr. Gauchez et le Dr. Bouvier de Marseille, le Dr. Jouannelle-Sulpicy de Martinique, les Dr. Lavoine, Valo, Croue et Verrièle d'Angers, le Pr. Le Bail le Dr. Eimer, le Dr. Castain du CHU de Bordeaux, le Dr. Réau de Bordeaux, le Dr. Lhermitte de la Réunion, le Dr. Milin de Poitiers, le Dr. Poizat de Montpellier, le Dr. Sader Ghorra de Beyrouth, le Dr. Savel de La Roche sur Yon, le Pr. Uro-Coste du CHU de Toulouse, le Dr. Valmary de Besançon et le Dr. Weingertner de Strasbourg.

Je remercie enfin les médecins cliniciens qui ont bien voulu répondre à notre questionnaire concernant le suivi des patients de l'étude.

TABLE DES MATIERES

A- INTRODUCTION.....	13
I- GENERALITES SUR LES SARCOMES DES TISSUS MOUS.....	13
1- Définition et classification des sarcomes des tissus mous.....	13
2- Démarche diagnostique.....	13
3- Classification histologique des tumeurs des tissus	14
4- Prise en charge anatomo-pathologique des sarcomes des tissus mous.....	17
a- Prise en charge du matériel tumoral.....	17
b- Diagnostic histologique des sarcomes et apport de l'immunohistochimie...	18
c- Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des sarcomes.....	18
5- Facteurs pronostiques et Staging anatomo-clinique des sarcomes des tissus mous...	21
6- Approches thérapeutiques des sarcomes des tissus mous de l'adulte.....	23
a- Généralités.....	23
b- Traitement chirurgical.....	24
c- Radiothérapie.....	25
d- Chimiothérapie.....	25
II- CAS PARTICULIERS DES SARCOMES SINONASaux.....	27
1- Anatomie du tractus sinonasal.....	27
2- Données épidémiologiques sur les tumeurs sinonasales.....	28
III- UNE NOUVELLE ENTITE DE SARCOMES A TRANSLOCATION : LE SARCOMES SINONASAL BIPHENOTYPIQUE : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	29
1- 2012 : la première série de BSNS et la caractérisation cytogénétique.....	29
2- Caractérisation moléculaire du BSNS : le gène de fusion PAX3-MAML3.....	30
3- Les nouveautés depuis 2014.....	30
4- Objectifs de notre étude.....	36

B- CARACTERISATION ANATOMO-CLINIQUE, IMMUNOHISTOCHEMIE ET MOLECULAIRE DU BSNS A PARTIR D'UNE SERIE DE 41 CAS.....	37
1-Matériels et méthodes.....	37
2-Résultats.....	42
3-Discussion.....	56
C- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	64
D- BIBLIOGRAPHIE.....	65
E- ANNEXES.....	73
Protocole détaillé de l'analyse par FISH	
F - ARTICLE SOUMIS (décembre 2018).....	74

Clinicopathological and molecular features of a series of 41 biphenotypic sinonasal sarcoma expanding their molecular spectrum, Le Loarer F1,2,3*, Laffont S1*, Lesluyes T3,4, Tirode F5,6, Antonescu C7, Baglin AC8, Delespaul L3,4, Soubeyran I1,3, Hostein I1, Pérot G1, Chibon F3,4, Massière J3, Le Guellec S9, Karanian M5,6,10, Costes-Martineau V11, Castain C12, Eimer S12, Le Bail B2,12, Wassef M8¶, Coindre JM1,2,3¶

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

- ARMS : Rhabdomyosarcome alvéolaire
- BSNS : Sarcome sinonasal biphénotypique
- EPU : Enseignement post-universitaire
- ERMS : Rhabdomyosarcome embryonnaire
- FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
- GIST : Tumeur stromale gastro-intestinale
- HES : Hematoxyline-Eosine-Safran
- LMS : Léiomyosarcome
- MPNST : Tumeur maligne des gaines des nerfs périphériques
- RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
- TDM : Tomodensitométrie
- TFS : Tumeur fibreuse solitaire
- UPS : Sarcome indifférencié à cellules pléomorphes (ex-histiocytofibrome malin)

A- INTRODUCTION

I- GENERALITES SUR LES SARCOMES DES TISSUS MOUS :

1- Les sarcomes des tissus mous : définition

Les tissus mous sont définis comme les tissus non épithéliaux de l'organisme, à l'exclusion du tissu osseux, du tissu lymphoïde, du système nerveux central et des tissus mésenchymateux présents dans les viscères (utérus, tube digestif). Les tissus mous sont donc principalement représentés par le tissu musculaire strié, le tissu adipeux, le tissu conjonctif, les vaisseaux et le système nerveux périphérique (65).

Les tumeurs malignes des tissus mous, appelés sarcomes des tissus mous, sont des tumeurs rares représentant moins de 1 % des tumeurs malignes de l'adulte, mais formant un groupe de lésions extrêmement variées, de prise en charge difficile (2). Cliniquement, il s'agit le plus souvent de lésions profondes (sous-aponévrotiques), de taille supérieure à 5 cm, développées préférentiellement au niveau des extrémités, du tronc ou de la région tête et cou, même si toutes les localisations sont possibles. La plupart du temps, les sarcomes surviennent de novo, sans facteur étiologique identifiable. Plus rarement, la survenue de certains types particuliers de sarcomes est susceptible d'être favorisée par des facteurs environnementaux – comme l'irradiation-, ou une prédisposition génétique. C'est le cas par exemple du syndrome de Gardner ou des neurofibromatoses qui favorisent respectivement la survenue de tumeurs desmoïdes et de tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques. Enfin, on peut citer le rôle du virus HHV8 dans l'apparition des sarcomes de Kaposi.

2- Démarche diagnostique

Devant une suspicion clinique de sarcome des tissus mous, il est recommandé d'adresser le patient le plus tôt possible à un Centre de référence où une prise en charge multidisciplinaire sera possible. Par ailleurs, tous les sarcomes de prise en charge difficile doivent être discutés en RCP spécialisée.

L'imagerie (TDM et IRM) permet dans un premier temps de caractériser la tumeur, sa taille, son extension et de guider la biopsie. Elle permet également le bilan d'extension de la tumeur, à la recherche de métastases qui sont essentiellement pulmonaires. Le diagnostic définitif est ensuite histologique et repose le plus souvent sur la réalisation de micro-biopsies percutanées sous contrôle échographique ou scanographique. Eventuellement, une biopsie chirurgicale peut être discutée si la microbiopsie est non contributive. Le pathologiste confirme ainsi le caractère bénin ou malin de la tumeur et précise son type et son sous-type histologique. Le diagnostic histologique de ces lésions constitue un outil majeur pour l'évaluation des facteurs pronostiques et l'élaboration d'une stratégie thérapeutique adaptée, prenant en compte pour chaque patient l'ensemble des caractéristiques cliniques et histologiques. Il est donc essentiel pour le pathologiste et le clinicien de se référer à une classification histologique précise de ces tumeurs, et d'y associer un système de « grading » histopronostique.

Enfin, afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge de ces tumeurs, deux réseaux nationaux ont été créés : le *Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes ou RRePS*, dont le rôle est d'assurer une deuxième lecture des nouveaux cas de sarcome des tissus mous et des viscères, et le *Réseau de Référence Clinique des Sarcomes des tissus mous et des viscères ou NetSarc*, dont le rôle est d'assurer le traitement de ces patients.

3- Classification histologique des tumeurs des tissus mous

La classification de référence des tumeurs des tissus mous est actuellement celle de l'OMS 2013 (**Tableau 1**) (63,65). Elle repose sur la nature de la différenciation tumorale, c'est-à-dire le type de tissu formé par la tumeur, et non sur la cellule supposée être à l'origine de la tumeur. Cette classification distingue 9 types de tumeurs, divisés eux-mêmes en de très nombreux sous-types. Chaque type de tumeur est divisé en tumeurs bénignes, tumeurs à malignité intermédiaire et tumeurs malignes. La classification OMS de 2013 est multidisciplinaire, c'est-à-dire qu'elle définit les différentes entités à partir des données cliniques, d'imagerie médicale, histologiques, immunohistochimiques et moléculaires.

**Tableau 1 : Classification histogénétique des tumeurs des tissus mous
(OMS 2013)**

1. Tumeurs adipeuses
2. Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques
3. Tumeurs fibrohistiocytaires
4. Tumeurs musculaires lisses
5. Tumeurs péricytaires
6. Tumeurs musculaires striées
7. Tumeurs vasculaires
8. Tumeurs cartilagineuses et osseuses
9. Tumeurs de différenciation incertaine

Le grade histologique de malignité est le facteur pronostique le plus important pour évaluer le risque métastatique et la survie globale du patient. Le système de grading actuellement recommandé par l'OMS est celui de la Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC). Il repose sur trois critères histologiques : la différenciation, l'activité mitotique et le pourcentage de nécrose. Le pathologiste attribue un score allant de 1 à 3 à chacun de ces critères. Le grade histo-pronostique du sarcome est obtenu en faisant la somme de ces scores (**Tableau 2**) (16).

Tableau 2 : Grade FNCLCC des sarcomes des tissus mous

D'après l'E.P.U Tumeurs des tissus mous, 2015, Pr. J-M Coindre (64)

Différentiation tumorale :

Score 1 : Sarcomes qui ressemblent à un tissu adulte normal.

Score 2 : Sarcomes pour lesquels le diagnostic de type histologique est certain.

Exemple : liposarcome myxoïde.

Score 3 Sarcomes embryonnaires, synoviosarcomes, sarcomes épithélioïdes, sarcomes à cellules claires, sarcomes alvéolaires des parties molles, sarcomes indifférenciés et sarcomes pour lesquels le type histologique est incertain.

Index mitotique :

Score 1 : 0 à 9 mitoses pour 10 champs*

Score 2 : 10 à 19 mitoses pour 10 champs

Score 3 : plus de 19 mitoses pour 10 champs

Nécrose tumorale :

Score 0 : pas de nécrose

Score 1 : moins de 50 % de nécrose tumorale

Score : plus de 50 % de nécrose tumorale

Grade 1 : Score 2-3

Grade 2 : Score 4-5

Grade 3 : Score 6-8

Cependant, pour certains sarcomes, le type histologique détermine à lui seul le grade histo-pronostique. Par exemple, le liposarcome bien différencié est toujours considéré comme une tumeur de bas grade (G1) alors que la majorité des sarcomes à cellules rondes seront par définition des sarcomes de haut grade (G3) : seront ainsi classés en G3, les rhabdomyosarcomes, les synoviosarcomes, l'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing, le sarcome alvéolaire des parties molles, le sarcome épithélioïde, le sarcome à cellules claires, les sarcomes indifférenciés et les sarcomes peu différenciés dont le diagnostic de type histologique n'est pas certain (65).

4- Prise en charge anatomo-pathologique des sarcomes des tissus mous :

a- Prise en charge du matériel tumoral

La microbiopsie constitue actuellement le prélèvement standard initial à visée diagnostique. Par rapport à la biopsie chirurgicale, elle présente les avantages d'une faible morbidité, d'un gain de temps et d'un moindre coût. Néanmoins, le diagnostic du type histologique et l'évaluation du grade sont plus difficiles en raison de la faible quantité de matériel analysé. En cas d'échec de la microbiopsie, une biopsie chirurgicale est réalisée. Celle-ci doit être adressée au pathologiste à l'état frais pour congélation en vue d'éventuelles analyses moléculaires. Une biopsie exérèse est également possible en première approche en cas de petite lésion superficielle.

Dans un second temps, l'exérèse chirurgicale du sarcome est réalisée à visée thérapeutique. A l'examen macroscopique de la pièce d'exérèse, le pathologiste doit noter la localisation superficielle ou profonde de la tumeur, sa taille, ses rapports avec les structures normales, son caractère circonscrit ou infiltrant, et l'importance de la nécrose. Des prélèvements doivent si possible être effectués à l'état frais en vue de la cryopréservation qui est obligatoire pour toute suspicion de sarcome (38).

b- Diagnostic histologique des sarcomes des tissus mous - Apport de l'immunohistochimie :

Comme nous l'avons vu, les principaux objectifs de l'examen anatomopathologique sont d'établir le diagnostic définitif de sarcome en précisant son type histologique, et le cas échéant le sous-type histologique, d'évaluer les facteurs histo-pronostiques majeurs qui vont conditionner la prise en charge thérapeutique (en particulier : grade, présence d'embolies vasculaires, d'engainements péri-nerveux), et de préciser l'état des limites d'exérèse. Cette analyse microscopique doit toujours être confrontée aux données cliniques (âge, sexe, rapidité d'évolution, antécédent, siège exact, profondeur et taille de la lésion) et aux données d'imagerie.

Pour établir le diagnostic, le pathologiste analyse d'abord la morphologie de la lésion sur lame HES, c'est-à-dire l'architecture et la cytologie tumorales. Cette première analyse le guide dans le choix des techniques complémentaires à réaliser pour aboutir au diagnostic définitif. Après ce premier temps d'analyse morphologique de la tumeur, le pathologiste a souvent recours à un ou plusieurs marqueurs immunohistochimiques qui permettent d'une part d'éliminer le diagnostic de carcinome, de mélanome ou de lymphome, et d'autre part de mettre en évidence une ligne de différenciation, éventuellement spécifique d'un type histologique de sarcome (18). Par exemple, la positivité nucléaire de l'anticorps anti-myogénine indique une différenciation musculaire striée, alors que la positivité de l'anticorps anti-PS100 peut orienter vers une différenciation nerveuse.

c- Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des sarcomes :

*Apport diagnostique :

Depuis une vingtaine d'années, les progrès des techniques d'analyse du génome, du transcriptome et du protéome ont apporté de nouveaux outils pour affiner le diagnostic de nombreux sarcomes, aboutissant à l'élaboration d'une classification moléculaire des tumeurs, et plus particulièrement des sarcomes. Ainsi, la génétique moléculaire a permis d'identifier des tumeurs appartenant au même spectre malgré des morphologies différentes. C'est le cas par exemple du sarcome d'Ewing et de la

tumeur neuro-ectodermique périphérique/PNET qui partagent les mêmes anomalies chromosomiques.

Les tumeurs des tissus mous peuvent ainsi être classées selon le type d'anomalies moléculaires qu'elles comportent (28) : les tumeurs avec des anomalies moléculaires simples, le plus souvent spécifiques, et les tumeurs avec des anomalies moléculaires complexes, dites à profil génomique complexe (53), caractérisés par de nombreux gains et pertes géniques (principalement : le léiomyosarcome, le rhabdomyosarcome pléomorphe, le liposarcome pléomorphe, le myxofibrosarcome, l'angiosarcome et le sarcome indifférencié). Les sarcomes à profil génomique complexe représentent de 50 à 60 % des sarcomes (53). Parmi les anomalies moléculaires simples, on distingue : les translocations réciproques, les mutations activatrices (par exemple, les mutations de cKit et PDGFRA dans les GIST), les mutations inactivatrices - définies comme des modifications d'un ou plusieurs nucléotides de la séquence d'ADN-, et les amplifications simples (amplifications de MDM2 et CDK4 dans les liposarcomes bien différenciés et les liposarcomes dédifférenciés par exemple) (27).

Dans la suite de cette étude, nous nous intéresserons tout particulièrement aux translocations réciproques qui représentent 10 à 15 % des sarcomes (28). Il s'agit d'un échange de matériel entre deux chromosomes non homologues après cassure sur chacun des chromosomes impliqués. Si cet échange s'accompagne d'une perte de matériel génétique, il est déséquilibré, sinon la translocation est dite équilibrée. Les translocations réciproques aboutissent donc à la formation d'un gène chimérique, appelé gène de fusion, qui code pour une protéine de fusion spécifique de la tumeur et qui a souvent un rôle inducteur majeur dans la transformation tumorale. Ces gènes de fusion peuvent correspondre par exemple à des facteurs de transcription chimériques (ex : EWSR1-FLI1 dans le sarcome d'Ewing), ou encore à des protéines de fusion de type tyrosine kinase (ex : ETV6-NTRK dans le fibrosarcome infantile).

Les translocations réciproques dans les sarcomes sont le plus souvent spécifiques d'un type histologique. C'est pourquoi le transcrit de fusion (ARNm) constitue un marqueur moléculaire diagnostique précieux. C'est le cas par exemple de la détection de la translocation EWSR1-ETS dans le sarcome d'Ewing, ou de PAX3-FOXO1 dans le rhabdomyosarcome alvéolaire (8).

Pour mettre en évidence ces translocations spécifiques, les techniques d'analyse moléculaire de référence sont la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) et la RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). Elles ont l'avantage d'être

le plus souvent applicables sur du matériel fixé et inclus en paraffine, et non nécessairement sur du tissu frais comme pour la réalisation d'un caryotype.

La technique de FISH sur noyau interphasique permet de visualiser des séquences spécifiques d'acides nucléiques grâce à l'utilisation de sondes nucléotidiques simple brin marquées par un fluorochrome et complémentaires des séquences cibles que l'on veut détecter (14). La résolution est de l'ordre d'une centaine de kilobases. Pour la mise en évidence de translocations, l'utilisation de sondes encadrant le gène cible impliqué est la méthode de référence (sondes break-apart). A l'analyse en immunofluorescence, elle montre une séparation des deux sondes marquées par exemple en rouge et vert en cas de translocation impliquant le gène analysé, alors que les deux signaux restent accolés lorsque le gène n'est pas réarrangé. L'inconvénient de cette technique par sonde « break-apart » est de n'identifier que l'un des partenaires impliqués dans la translocation. Elle peut donc être non spécifique pour certains types de sarcomes comme les sarcomes à translocation EWSR1.

La technique de RT-PCR met en évidence des translocations en amplifiant la zone de jonction entre les deux chromosomes et en plaçant une amorce de chaque côté de cette jonction. Chaque couple d'amorces est spécifique d'un transcrite de fusion. Après les étapes d'extraction de l'ARN tumoral et de transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), l'amplification sélective est effectuée in vitro et consiste en une répétition de cycles de dénaturation, hybridation et extension. S'il n'existe pas de translocation, il n'y aura pas d'amplification exponentielle, tandis que si la translocation existe, il y aura une amplification exponentielle. La RT-PCR en temps réel permet la détection en temps réel de la quantité d'ADNc polymérisée à chaque cycle à l'aide d'un fluorochrome. L'analyse des courbes d'amplification permet une mesure quantitative de l'ARN tumoral et le suivi précis et rapide de l'amplification (9, 28).

Plus récemment, le séquençage à haut débit de l'ARN tumoral (RNAseq) appliqué aux sarcomes a permis de mettre en évidence de nouvelles translocations spécifiques et ainsi de caractériser de nouvelles entités de sarcomes, ou bien de reclasser certains sous-types histologiques de sarcomes.

*Apports pronostique et thérapeutique

La détection d'anomalies moléculaires spécifiques contribue également au pronostic : en effet, le type de transcrit, ou encore la présence d'un transcrit spécifique peut modifier le pronostic du sarcome. C'est le cas du rhabdomyosarcome alvéolaire, caractérisé par l'existence de translocations chromosomiques conduisant à la synthèse d'un facteur de transcription chimérique fusionnant FOXO1 soit avec PAX3 (environ 80% des cas), soit avec PAX7 (environ 20%). La caractérisation du gène partenaire de FOXO1 est utile car les fusions avec PAX7 sont de meilleur pronostic que celles avec PAX3 (8).

Enfin, l'analyse moléculaire des sarcomes a aussi un intérêt thérapeutique : le protocole de traitement, essentiellement le type d'agent cytotoxique et la dose de chimiothérapie, est adapté au type de sarcome. Par ailleurs, les anomalies génétiques spécifiques constituent des cibles de prédilection pour de nouvelles approches thérapeutiques comme les inhibiteurs de tyrosine kinase dans les GIST.

5- Facteurs pronostiques des sarcomes des tissus mous :

Les sarcomes des tissus mous récidivent localement dans 10 à 20 % des cas et donnent des métastases principalement pulmonaires dans 30 à 50 % des cas. La survie globale, qui dépend surtout de la présence de métastases, varie de 40 à 60 % suivant les séries (2, 37).

*Le principal facteur prédictif de récurrence locale est la qualité des marges d'exérèse chirurgicale : R₀ : exérèse complète ; R₁ : résidu tumoral microscopique (histologique) ; R₂ : résidu tumoral macroscopique.

Les autres facteurs de récurrences locales sont un grade histo-pronostique élevé et l'absence de radiothérapie adjuvante (29, 46).

*Le grade histologique, comme défini précédemment (cf. Grade FNCLCC des sarcomes des tissus mous), est considéré comme le facteur principal de prédiction des métastases et de la survie globale des sarcomes des tissus mous de l'adulte. Il est réalisé uniquement sur les tumeurs malignes, sur la tumeur primitive, et avant traitement (46).

Cependant, l'utilisation devenue presque systématique de la microbiopsie rend difficile l'évaluation correcte du grade histologique en raison de la faible

représentativité de la tumeur sur ce type de prélèvement exigü. De plus, les traitements sont de plus en plus adaptés au type histologique ou moléculaire du sarcome, et non plus au grade histologique.

Les autres facteurs pronostiques à prendre en compte sont principalement :

*Les facteurs cliniques : il s'agit de la profondeur de la tumeur (localisation en dessous du fascia superficiel) et de la taille de la tumeur (plus de 5 ou de 10 cm de diamètre).

D'autres facteurs cliniques sont parfois retenus : envahissement des structures vasculo-nerveuses et/ou osseuses, âge du malade, sexe masculin, présence de symptômes lors de la présentation initiale, rechute locale.

*La combinaison du grade histologique, de la profondeur et de la taille de la tumeur permet de définir des groupes de malades de pronostic différent. Le système de référence est le staging anatomo-clinique de l'American Joint Committee (AJC) et UICC, modifié en 1997 : il prend en compte la taille et l'extension de la tumeur primitive (T), l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux (N), la présence de métastases (M) et le grade du sarcome (G).

T : Tumeur primitive

T1 : ≤ 5 cm de diamètre

T1a : tumeur superficielle (c'est-à-dire entièrement située au-dessus de l'aponévrose superficielle)

T1b : tumeur profonde

T2 : > 5 cm de diamètre

T2a : tumeur superficielle

T2b : tumeur profonde

N : Adénopathies satellites

N0 : pas d'adénopathie

N1 : envahissement des ganglions régionaux

M : Métastases à distance

M0 : pas de signe de métastase

M1 : présence de métastases

G : Grade histopronostique (G1, G2, G3, G4)

Groupement par stades :

Stade IA	G1,2	T1	N0	M0
Stade IB	G1,2	T2	N0	M0
Stade IIA	G3,4	T1	N0	M0
Stade IIB	G3,4	T2a	N0	M0
Stade III	G3,4	T2b	N0	M0
Stade IV	tous G tous G	tous T tous T	N1 tous N	M0 M1

Cependant, du fait de sa relative complexité, ce système est peu utilisé en pratique, en particulier en France. Enfin, les nomogrammes constituent un autre système de staging anatomo-clinique de plus en plus utilisé aux USA. Mis au point par le Memorial Sloan Kettering Cancer Center, ce système repose sur l'évaluation de 5 paramètres : la taille de la tumeur, sa profondeur par rapport à l'aponévrose superficielle, son siège, le type histologique de sarcome et l'âge du patient. Cependant, comme nous l'avons vu, le grading histologique présente plusieurs limitations, en particulier depuis la généralisation des microbiopsies diagnostiques. Avec l'émergence d'une classification moléculaire des sarcomes, un grading moléculaire apparaît donc comme une alternative possible dans un avenir proche, permettant une meilleure reproductibilité, surtout sur microbiopsies.

6- Approches thérapeutiques des sarcomes des tissus mous de l'adulte.

a- Généralités :

Chaque nouveau cas de sarcome doit être discuté en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) faisant intervenir radiologue, pathologiste, chirurgien, radiothérapeute et chimiothérapeute. Les objectifs du traitement des sarcomes sont le contrôle locorégional de la tumeur et le contrôle de la diffusion à distance sous forme de micrométastases.

*Le traitement standard chez l'adulte est l'exérèse chirurgicale large monobloc avec marges histologiques saines (R0). Il convient d'éviter toute effraction tumorale per-opératoire pour limiter le risque de poursuite évolutive malgré l'exérèse de la tumeur.

En cas de fragmentation de la tumeur, ou si les marges d'exérèse sont positives (R1 ou R2), une reprise chirurgicale est recommandée.

*Ce traitement chirurgical peut être précédé ou suivi d'une radiothérapie et/ou d'une chimiothérapie. Les sarcomes étant peu chimio-sensibles, la chimiothérapie est essentiellement indiquée en traitement palliatif chez un patient métastatique, ou bien lorsque l'exérèse de la tumeur n'est pas possible d'emblée (taille et/ou localisation tumorale, comorbidités). L'anthracycline est utilisée en première ligne. Selon les recommandations ESMO 2012, la radiothérapie est indiquée en traitement adjuvant pour les sarcomes profonds de haut grade (grades 2 et 3). Elle améliore le contrôle local de la maladie mais n'a pas d'impact sur la survie globale. La radiothérapie néo-adjuvante est une autre option envisageable, mais elle augmente le risque de complications post opératoires, en particulier en retardant la cicatrisation.

b- Traitement chirurgical :

Il existe quatre types principaux de traitement chirurgical d'un sarcome des tissus mous, auxquels correspondent des risques de récurrence locale différents.

- **L'exérèse marginale ou énucléation** : il s'agit d'une exérèse limitée à la tumeur elle-même, sans tissu sain périphérique, et qui utilise le plan de clivage naturel situé au niveau de la pseudo-capsule. Il subsiste donc toujours un résidu microscopique tumoral après ce type d'exérèse. Le taux de récurrence locale est élevé, de l'ordre de 40 à 100 % (1).

- **L'exérèse locale large** : elle correspond à la résection de la tumeur, de la pseudo-capsule et de quelques centimètres de tissus normaux autour. Le taux de récurrence locale est de 30 à 50 %. Le risque d'une rechute locale est faible après une telle exérèse sur des tumeurs superficielles.

- **La compartimentectomie** : elle correspond à l'exérèse complète de tout le compartiment cellulo-musculaire atteint, emportant le ou les muscles atteints, de leur origine à leur terminaison, ainsi que les axes vasculo-nerveux qui les traversent.

L'inconvénient majeur de ce type de chirurgie est l'existence de graves séquelles fonctionnelles. Le taux de récurrence locale est de 10 à 20 % (2).

- **L'amputation ou désarticulation** dont le niveau est défini par la nécessité d'enlever l'ensemble des tissus atteints. Même après une telle exérèse, le risque de récurrence locale n'est pas nul et reste de 10-20 % suivant les localisations.

c- Radiothérapie :

Il s'agit surtout de la radiothérapie externe qui est la plupart du temps associée à une exérèse chirurgicale. Elle peut être pré-opératoire, mais elle est surtout utilisée en post-opératoire. La radiothérapie postopératoire permet une tolérance immédiate plus satisfaisante mais les séquelles tardives apparaissent plus marquées. Le bénéfice en contrôle local est cependant similaire. Selon les recommandations ESMO 2018 (52), la radiothérapie adjuvante est indiquée pour les sarcomes des tissus mous profonds de haut grade (G2 et G3).

En pré-opératoire, les champs d'irradiation doivent couvrir le volume tumoral macroscopique, le compartiment anatomique et le trajet biopsique. En post-opératoire, elle doit couvrir le lit tumoral, le trajet utilisé pour la voie d'abord avec des marges de sécurité de 5 à 7 cm dans tous les plans, en respectant les barrières anatomiques.

La dose de radiothérapie est de 50 Gy en 5 semaines (ou 50,4 Gy en 28 séances), avec un complément de dose de 10 Gy (ou 9 Gy en 5 séances) au niveau du lit tumoral notamment en cas de marges microscopiquement envahies.

d- Chimiothérapie :

L'objectif de la chimiothérapie est le contrôle systémique de la maladie. Ses principales indications sont les sarcomes non résectables ou métastatiques (traitement palliatif). Cependant, les sarcomes étant peu chimiosensibles, les molécules efficaces sont peu nombreuses. Les deux drogues les plus efficaces sont la doxorubicine et l'isofosfamide. Le standard de traitement pour un patient porteur d'un sarcome des tissus mous métastatique reste toutefois la doxorubicine (Anthracycline) en monothérapie (47). La trabectedine, le paclitaxel ou la gemcitabine sont également efficaces et utilisables en cas d'échec de la première ligne de chimiothérapie. D'autres drogues sont en cours de développement (inhibiteurs de mTOR dans les PEComes,

agents anti-angiogéniques) et permettent un traitement de plus en plus ciblé, en fonction du type histologique ou des anomalies moléculaires. En fonction de la situation clinique, il existe 3 types de chimiothérapie :

- *Chimiothérapie palliative* : elle est administrée pour une tumeur métastatique, ou localement très évoluée, dans le but d'entraîner une amélioration de la survie tout en préservant la qualité de vie. La chimiothérapie initiale de référence est dans ce cas une mono-chimiothérapie par doxorubicine.

- *Chimiothérapie adjuvante* : elle est administrée après contrôle local de la tumeur primitive. Son but est de prévenir une éventuelle dissémination micrométastatique. Cependant, l'efficacité de la chimiothérapie dans cette indication reste discutée. Elle est surtout utilisée pour les tumeurs à haut risque de rechute (grade 3 de la FNCLCC) (46).

- *Chimiothérapie néo-adjuvante* : elle est administrée en première intention avant la chirurgie pour une tumeur localement évoluée, dans le but de faciliter le traitement local conservateur. Elle permet aussi une évaluation de l'efficacité de la chimiothérapie sur une tumeur donnée.

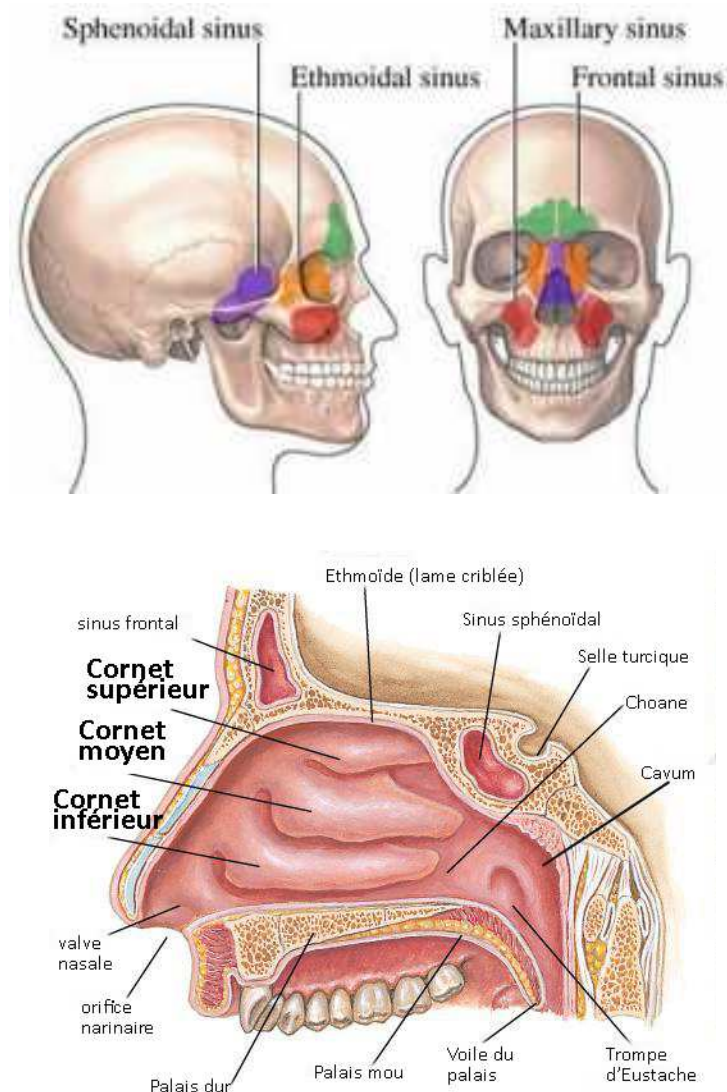
II- CAS PARTICULIERS DES SARCOMES SINO-NASaux :

1- Anatomie du tractus sinonasal :

Le tractus sinonasal comprend le sinus maxillaire, le sinus frontal, l'ethmoïde (ou lame criblée), le sinus sphénoïdal, les fosses nasales et le cavum ou nasopharynx (**Figure 1**).

Les tumeurs sinonasales agressives localement peuvent donc s'étendre aux tissus de voisinage (os et muscles), et en particulier infiltrer la lame orbitaire de l'ethmoïde (lame papyracea) et la base antérieure du crâne. Plus rarement, une extension intracrânienne est possible (59).

Figure 1 : Anatomie du tractus sinonasal



2- Données épidémiologiques sur les tumeurs sino-nasales :

Les sarcomes représentent environ 3 % des tumeurs malignes du tractus sinonasal, les plus fréquentes étant le carcinome épidermoïde puis le lymphome, l'adénocarcinome et le mélanome. Les sarcomes de la tête et du cou représentent entre 5 et 15 % de l'ensemble des sarcomes des tissus mous (2, 49). Enfin, les sarcomes du tractus sinonasal représentent moins de 10 % des sarcomes tête et cou. Cependant ils sont associés à une morbidité et une mortalité élevées en raison de leur situation anatomique particulière, à proximité immédiate des orbites et du cerveau (37).

Dans le tractus sinonasal, on retrouve essentiellement les mêmes types de sarcomes que dans les autres localisations, à savoir les rhabdomyosarcomes et léiomyosarcomes, les fibrosarcomes, les tumeurs malignes du système nerveux périphérique (MPNST), les angiosarcomes, les synovialosarcomes et les tumeurs fibreuses solitaires malignes. D'après l'article de Szablewski et al. (2) portant sur 48 sarcomes du tractus sinonasal, les plus fréquents sont : les ARMS (33.3 %), les sarcomes inclassés (14.6 %), les ERMS (14.6 %), et le LMS (12.5 %). Les seules tumeurs des tissus mous spécifiques au tractus sinonasal sont l'angiofibrome naso-pharyngé, l'hémangiopéricytome sinonasal et le sarcome sinonasal biphénotypique (BSNS), la nouvelle entité qui fait l'objet de notre étude.

D'après la eReview of the SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) database, la survie à 5 ans de l'ensemble des sarcomes sinonasaux est de 47%.

III- UNE NOUVELLE ENTITE DE SARCOMES A TRANSLOCATION : LE SARCOMES SINONASAL BIPHENOTYPIQUE DANS LA LITTERATURE

Le sarcome sinonasal biphénotypique (« Biphenotypic sinonasal sarcoma » ou BSNS) est une nouvelle entité de sarcome de bas grade, caractérisée au niveau morphologique et immunohistochimique par une double différenciation musculaire et nerveuse. Sur le plan moléculaire, le BSNS se caractérise par la présence récurrente et spécifique de la translocation t(2 ;4)(q35 ;q31.1), aboutissant à la synthèse de la protéine de fusion PAX3-MAML3. Le BSNS a ainsi été identifié pour la première fois en 2012 (25), par l'équipe de J. T. Lewis et al. de la Mayo Clinic (Rochester, USA), comme une entité à part entière, et récemment introduite dans la nouvelle classification OMS 2017 des tumeurs de la tête et du cou.

1- 2012 : la première série de BSNS et la caractérisation d'une translocation spécifique (25):

En avril 2012, l'équipe de J. T. Lewis et al. de la Mayo Clinic (Rochester, USA) publie une première série de 28 cas aboutissant à l'identification du BSNS comme nouvelle entité, caractérisée par un ensemble de critères cliniques, morphologiques et immunohistochimiques.

Par ailleurs, une analyse cytogénétique par caryotype réalisée sur deux cas de la série permet d'identifier la translocation spécifique t(2 ;4)(q35 ;q31.1).

*Dans cette série, les patients atteints sont majoritairement des femmes et l'âge moyen est de 52 ans. Les localisations les plus fréquentes sont la cavité nasale et l'ethmoïde. L'infiltration des tissus osseux de voisinage par le sarcome est relativement fréquente (21 %), ainsi que les récurrences locales (7/16 ; 44 %). Au cours du suivi, les auteurs n'ont relevé aucune métastase à distance, ni aucun décès, secondaires au BSNS.

*Au niveau morphologique, la tumeur est mal limitée, constituée de faisceaux de cellules fusiformes monomorphes au noyau allongé peu atypique. La nécrose est absente et l'activité mitotique très faible. Dans de rares cas (3/28), est observée une différenciation rhabdomyoblastique, caractérisée par de grandes cellules à cytoplasme éosinophile, renfermant parfois des striations focales. Focalement, les auteurs observent également des noyaux ondulés suggérant une différenciation nerveuse.

*L'analyse immunohistochimique montre un marquage positif pour la PS100 (28/28 ; 100 %), et la positivité de l'AML dans la majorité des cas (25/26 ; 96 %). La desmine est positive sur 4 cas. Aucun des cas de la série n'est positif pour la myogénine. De rares cas montrent une positivité focale pour le CD34, l'AE1-AE3 ou l'EMA.

2- Caractérisation moléculaire du BSNS : le gène de fusion spécifique PAX3-MAML3 (43):

En 2014, l'équipe de Wang, J.T. Lewis et al. (Mayo clinic, Rochester, USA) reprend 25 BSNS parmi la série initiale de 28 cas. A partir d'un cas index présentant la translocation t(2;4)(q35;q31.1) mise en évidence en 2012, les auteurs réalisent une analyse de transcriptome qui met en évidence le gène de fusion spécifique PAX3-MAML3 résultant de cette translocation.

Enfin, la réalisation de FISH break apart et de RT-PCR spécifiques sur les 24 autres cas de la série, confirme la présence récurrente du gène de fusion spécifique PAX3-MAML3 dans le BSNS.

3- Les nouvelles publications depuis 2014 :

a) Deux gènes de fusion alternatifs dans le BSNS :

En 2015 et 2016 est démontrée l'existence de deux gènes de fusion alternatifs à la fusion PAX3-MAML3, présents dans de rares cas de BSNS.

En 2015, l'équipe de Wong, Fletcher et al. (Boston) publie 1 cas de BSNS chez un jeune homme de 33 ans, positif en FISH et RT-PCR pour la fusion PAX3-FOXO1 (3). Par ailleurs, il est noté pour la première fois une positivité focale de l'anticorps anti-myogénine, spécifique d'une différenciation musculaire striée.

Puis, en 2016, l'équipe de Huang, Antonescu, et al. (Memorial, New York, USA) publie une série de 7 cas de BSNS parmi lesquels 2 cas sont caractérisés par le gène de fusion PAX3-NCOA1 (32). Concernant les 5 autres cas de la série, 4 cas présentent le gène de fusion canonique PAX 3-MAML3, et 1 cas présente un réarrangement de PAX3 avec un partenaire inconnu (PAX3-X).

b) De 28 à 44 cas de BSNS : une analyse moléculaire étendue (15)

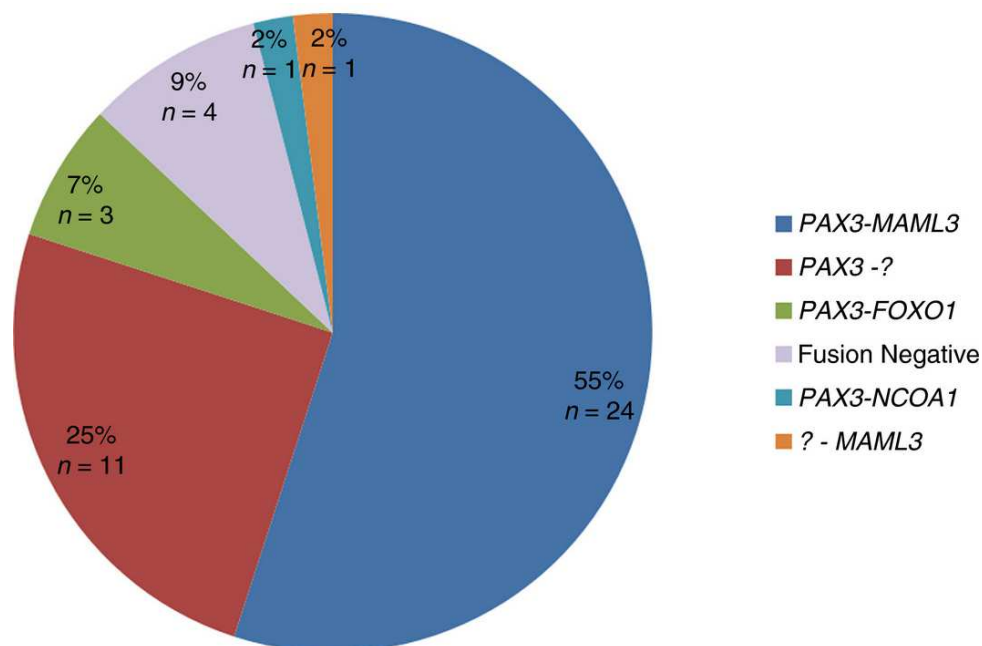
En décembre 2016, Fritchie, Wang, J. E. Lewis et al. complètent leur série de référence initiée en 2012 à partir des Archives de la Mayo clinic : elle passe de 28 à 44 cas et des analyses moléculaires complémentaires révèlent que **seulement 55 % des cas de cette série sont caractérisées par le gène de fusion PAX3-MAML3**.

En effet, outre la détection **d'1 nouveau cas de fusion PAX3-NCOA1** et de **3 nouveaux cas de fusion PAX3-FOXO1**, cette série de 44 cas comprend (**Figure 2**) :

- 1 cas de fusion entre MAML3 et un partenaire inconnu (FISH MAML3 +)
- 4 cas où ni PAX3 ni MAML3, ni NCOA1/2, ni FOXO1 ne sont réarrangés
- 11 cas présentant un réarrangement de PAX3 avec un partenaire inconnu (PAX3-X).

Les auteurs ont réalisé des analyses de RNAseq sur les 11 cas PAX3-X dans le but d'identifier un ou plusieurs nouveaux partenaires de PAX3. Néanmoins, la technique a échoué en raison d'une qualité insuffisante de l'ARN tumoral.

Figure 2 : Transcrits de fusion dans le BSNS (15)



Par ailleurs, l'analyse de cette série semble montrer que les patients PAX-FOXO1 + sont plus jeunes (médiane = 35 ans) que ceux PAX3-MAML3 +, alors que les cas PAX3 -X sont plus âgés (médiane = 60ans). Cependant ces moyennes sont calculées à

partir d'un très faible nombre de cas. Aucune particularité morphologique ou immunohistochimique n'est mise en évidence selon le type de transcrite de fusion détecté. Par ailleurs, les données de suivi sont encore insuffisantes pour déterminer s'il existe une corrélation entre le type de transcrite et un pronostic particulier.

Enfin, au niveau immunohistochimique, la PS100 était positive dans 98 % des cas (43/44) et l'AML dans 93 % des cas (41/44). La desmine était positive dans 36 % des cas (16/44).

Cependant, seulement 25 % des cas (11/44) cas étaient positifs pour l'anti-MyoD1, et 8 % (2/23) focalement positifs pour l'anti-myogénine.

c) Profil immunohistochimique étendu sur une série de 11 cas (5):

En 2016, l'équipe de Rooper, Huang, Antonescu et al. (Memorial, NY, USA), publie une série de 11 cas, parmi lesquels 4 cas déjà publiés la même année par la même équipe (article PAX3-NCOA1). Pour 8 cas sur 11, le diagnostic de BSNS avec translocation PAX3-MAML3 (5 cas), ou PAX3-NCOA1 (1 cas déjà publié), ou PAX3-X (2 cas) a été confirmé par analyse FISH. Pour les 3 autres cas, le diagnostic de BSNS reposait uniquement sur la morphologie et le profil immunohistochimique. Dans cette série, tous les cas étaient positifs pour la PS100 et l'AML. La desmine était focalement positive dans 4 cas sur 11, la myogénine dans 3 cas sur 10. La nouveauté dans cette étude a consisté en l'analyse de 2 autres marqueurs immunohistochimiques : la Beta-caténine, dont l'expression nucléaire est rapportée dans de nombreuses tumeurs malignes, et le SOX10, qui est positif dans les schwannomes et parfois focalement positif dans les MPNST et les tumeurs de Triton. **Les auteurs ont ainsi mis en évidence une positivité de la Béta-caténine dans 10 cas sur 11 (91 %), alors que le SOX 10 était négatif sur l'ensemble des cas de la série.** Ces deux résultats représentent donc des outils diagnostiques supplémentaires dans le diagnostic du BSNS, en particulier pour le différencier du schwannome cellulaire et des MPNST/Tumeurs de Triton qui sont deux diagnostics différentiels majeurs du BSNS.

d) Evaluation immunohistochimique de la bêta-caténine sur une nouvelle série de 6 cas de BSNS (4):

En avril 2018, l'équipe de Kakkar et al. (New Dehli) publie une série de 6 cas de BSNS, diagnostiqués sur des critères morphologiques et immunohistochimiques, en l'absence d'analyse moléculaire. L'objectif était de comparer les résultats de l'immunomarquage anti-bêta caténine réalisé sur les 6 cas de BSNS et sur 21 cas témoins, correspondant aux principaux diagnostics différentiels des BSNS : Hémangiopéricytome sinonasal (SNHPC), tumeurs fibreuses solitaires (TFS) et synoviosarcome. L'analyse a montré une positivité nucléaire de la bêta-caténine dans 5 cas sur 6 de BSNS (83.3 %), et dans 60 % des SNHPC. En conclusion, la bêta caténine semble bien jouer un rôle dans l'oncogenèse du BSNS. Cependant elle a un rôle limité pour son diagnostic en raison de son manque de spécificité.

e) L'anticorps anti-PAX3 : un nouvel outil diagnostique dans le BSNS (13) ?

En mai 2018, l'équipe de Jo, Mariño-Enríquez A, Fletcher et al. (Boston), publie une série de 15 cas de BSNS, parmi lesquels 1 cas déjà publié par la même équipe en 2015 et caractérisé par une translocation PAX3-FOXO1, et 9 cas présentant un réarrangement de PAX3 mis en évidence par FISH PAX3. Cette série de BSNS est comparée à une série de cas témoins comprenant 10 cas de chacune des entités suivantes, considérées comme étant les principaux diagnostics différentiels du BSNS : MPNST, Synoviosarcome, rhabdomyosarcome à cellules fusiformes, Tumeur fibreuse solitaire, Hémangiopéricytome sinonasal, Schwannome cellulaire et rhabdomyosarcome alvéolaire. L'analyse immunohistochimique montre que 100 % des BSNS sont positifs pour l'anticorps monoclonal anti-PAX3. Les cas témoins sont tous négatifs pour l'anti-PAX3, sauf 1 cas de RMS à cellules fusiformes et 8 RMSA sur 10, ce qui paraît cohérent avec la présence récurrente d'un réarrangement de PAX3 dans ce type de rhabdomyosarcome.

Les auteurs analysent également l'anticorps anti-PAX8 : 100 % des BSNS sont positifs pour cet anticorps (probable réaction croisée), mais c'est le cas également pour de nombreux cas témoins et tous les RMSA, ce qui en fait un marqueur peu spécifique et d'intérêt limité pour le diagnostic de BSNS.

Par ailleurs le panel de marqueurs immunohistochimiques réalisés usuellement sur les BSNS montre que 14 cas sur 15 sont positifs pour la PS100, 15 cas sur 15 pour l'AML. 2 cas sur 11 (9%) sont positifs pour la myogénine et 10 cas sur 15 (67 %) sont positifs pour la desmine. Le SOX 10 est bien négatif sur l'ensemble des cas de la série. Les anticorps anti-EMA et anti-TLE1 sont positifs dans respectivement 5 cas et 4 cas sur 8 analysés.

Enfin, 12 cas sur 14 montrent une positivité cytoplasmique pour l'anti-pan TRK associé à la surexpression des gènes de fusion NTRK, en particulier de NTRK3 (43), connu pour être exprimé au cours de la différenciation du tissu nerveux pendant l'embryogénèse. Inversement, cet anticorps reste négatif dans les MPNST et les synoviosarcomes.

En conclusion, les auteurs ont mis en évidence un nouvel outil immunohistochimique utile au diagnostic de BSNS : la positivité de l'anticorps anti-PAX3 dans le BSNS apparaît en effet comme très sensible (100%) et spécifique (98 %).

f) Une synthèse anatomo-clinique et moléculaire des séries de BSNS publiées entre 2012 et 2018 (6):

En août 2018, S. Andreasen, J. A. Bishop et al. publient une *review* des différentes séries de BSNS déjà publiées. De manière globale, sur l'ensemble des cas publiés entre 2012 et 2018, la translocation la plus fréquente est PAX3-MAML3 (58.6%), alors que les translocations alternatives sont représentées comme suit : réarrangement isolé de PAX3 (19.2%), absence de réarrangements (9.1%), PAX3-FOXO1 (8.1%), PAX3-NCOA1 (4%), et réarrangement isolé de MAML3 (2%). Au niveau du profil immunohistochimique, les auteurs résument l'ensemble des données sous forme d'un tableau (**Tableau 3**).

Cependant, les résultats ne sont pas tous statistiquement significatifs car il existe vraisemblablement des séries redondantes, comme celles de Fritchie (N = 44) qui vient compléter la série antérieure de Lewis (N = 28).

Tableau 3 : Synthèse du profil immunohistochimique du BSNS dans la littérature (6)

AE1/ AE3	β- Catenin	CD34	Desmin	EMA	Factor XIIIa	Melan. A	MSA	MyoD1	Myogenin	NTRK3	PAX3	PAX8	SMA	SOX10	STAT6	S100
Present series	3/3	0/3	2/3	0/3	ND	0/3	3/3	1/3	ND	ND	ND	1/3	3/3	0/3	3/3	3/3
Wang [8]	ND	ND	4/23	ND	ND	0/22	ND	4/22	0/22	24/25	23/23	ND	22/24	ND	ND	25/25
Lewis [9]	2/22	5/22	4/20	3/19	ND	ND	14/16	ND	ND	ND	ND	ND	23/25	ND	ND	28/28
Huang [11]	2/5	1/5	4/7	ND	ND	ND	4/4	3/7	1/7	ND	ND	ND	5/5	0/7	ND	7/7
Fritchie [12]	ND	ND	16/44	ND	ND	ND	ND	ND	2/23	ND	ND	ND	39/42	ND	ND	42/43
Rooper [17]	ND	ND	4/11	ND	8/10	ND	ND	ND	3/10	ND	11/11	ND	11/11	0/11	ND	ND
Lin [21]	ND	0/1	1/1	0/1	ND	ND	ND	1/1	1/1	ND	ND	ND	1/2	ND	ND	1/1
Wong [20]	ND	ND	1/1	0/1	ND	ND	ND	ND	1/1	ND	ND	ND	1/1	ND	ND	1/1
Zhao [18]	0/3	0/3	1/3	ND	ND	ND	ND	1/1	ND	ND	ND	ND	3/3	0/3	ND	3/3
Powers [23]	0/1	ND	0/1	0/1	ND	ND	ND	ND	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1/1
Kakkar [24]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6/6	ND	ND	6/6
Triki [25]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1/1	ND	ND	1/1
Jo et al. [26]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13/13	13/13	ND	ND	ND	ND
Total	5/34	6/34	37/114	3/25	8/10	0/25	21/23	9/34	8/65	24/25	34/34	14/16	115/123	0/21	3/3	115/111

EMA epithelial membrane antigen, MSA muscle-specific actin, SMA smooth muscle actin, TLE1 transducing-like enhancer protein 1, ND not done

4- Objectifs de notre étude

Comme exposé précédemment, le BSNS est une nouvelle entité de sarcome des sinus de la face, d'évolution localement agressive. Du fait de sa rareté, le nombre de cas analysés reste encore restreint à ce jour, ce qui rend difficile une évaluation statistiquement significative de l'ensemble de ses caractéristiques, permettant un diagnostic reproductible et une prise en charge thérapeutique adaptée. Par ailleurs, certains points restent encore à élucider ou à préciser, en particulier concernant l'identification de nouveaux partenaires de fusion de PAX3, ou encore l'évaluation de certains marqueurs immunohistochimiques présentant un taux de positivité variable selon les séries. C'est le cas principalement des anticorps anti-myod1, anti-myogénine et anti-Béta-caténine. Les diagnostics différentiels sont nombreux et l'enjeu pour le patient est majeur (pronostic, thérapeutique, traitement conservateur/adjuvant). Afin de mieux caractériser cette nouvelle entité sur le plan histologique, immunohistochimique et moléculaire, et d'aboutir à des critères diagnostiques de plus en plus fiables et reproductibles dans la pratique quotidienne au laboratoire, nous avons réalisé une étude rétrospective à partir d'une série de 41 cas de BSNS diagnostiqués en France entre 2000 et 2018. Les cas étaient pour la plupart issus des Archives de l'Institut Bergonié à Bordeaux, où ils avaient fait l'objet d'une demande d'avis ou de relecture. Les autres cas provenaient de l'Hôpital Lariboisière à Paris et ont été rassemblés à Bordeaux pour la réalisation de l'étude.

Après double relecture histologique des lames HES de l'ensemble des cas de la série, il a été réalisé un panel immunohistochimique systématique, puis une analyse moléculaire ciblée par FISH et/ou RT-PCR. Pour certains des cas présentant un réarrangement de PAX3 avec un partenaire de fusion inconnu, une analyse par RNAseq a été réalisée dans deux centres spécialisés : le Centre National d'Analyses Génétiques (C.N.A.G.) de Barcelone (Espagne), et le Centre d'Analyses Génétiques de Lyon.

B- CARACTERISATION CLINICO-PATHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DU BSNS A PARTIR D'UNE SERIE DE 41 CAS.

Le sarcome sinonasal biphénotypique (BSNS) est une nouvelle entité de sarcome de bas grade à cellules fusiformes caractérisé par une double différenciation nerveuse et musculaire. Les récentes analyses moléculaires ont mis en évidence l'existence d'un gène de fusion récurrent et spécifique de cette entité, résultant de la translocation t(2 ;4) (q35 ;q31.1). Plus rarement, d'autres gènes de fusion ont été rapporté, principalement les transcrits PAX3-FOXO1 et PAX3-NCOA1. Dans notre série de 41 cases de BSNS, nous avons réalisé un large panel de marqueurs immunohistochimiques ainsi que des analyses moléculaires par FISH et RT-PCR afin de mieux caractériser cette nouvelle entité. L'évolution clinique a également été analysée.

Enfin, une analyse transcriptomique par RNA-seq, réalisée sur 3 cas présentant un réarrangement de PAX3 avec un partenaire de fusion inconnu, nous a permis d'identifier deux nouveaux transcrits de fusion : 1 cas de la série était caractérisé par la translocation PAX3-NCOA2 et 2 cas par la translocation PAX3-WWTR1.

1-Matériel et méthodes :

***Sélection des cas :**

Nous avons constitué une série de 41 BSNS à partir des Archives de deux laboratoires français d'Anatomo-Pathologie appartenant au réseau national des sarcomes (RRePS) et des tumeurs de la tête et du cou (REFCOR) : 16 cas nous ont été communiqués par l'Hôpital Lariboisière à Paris. Les 25 autres cas ont été diagnostiqués, ou bien communiqués pour relecture ou avis diagnostique, à l'Institut Bergonié à Bordeaux. Tous les cas ont fait l'objet d'un prélèvement à visée diagnostique entre janvier 2000 et juin 2018. Les critères d'inclusion étaient : la morphologie à l'analyse histologique, la localisation et la positivité de l'anticorps anti-PS100. Les échantillons tumoraux analysés étaient fixés en formol neutre tamponné et inclus en paraffine. Les données cliniques suivantes ont été recueillies : âge au diagnostic, sexe, taille et localisation tumorale, traitement initial et suivi. L'ensemble des cas a fait l'objet d'une double relecture microscopique par deux pathologistes (JMC, SL). L'approbation des comités d'éthique appropriés a été obtenue pour la réalisation de l'étude. Tous les cas étaient

enregistrés dans la base nationale de référence des sarcomes (RRePS), approuvée par le Comité de protection des données personnelles (CNIL).

***Analyse immunohistochimique :**

Les anticorps suivants ont été utilisés, et l'analyse a été réalisée sur un automate Benchmark Ultra (Roche Ventana, Meylan, France), utilisant le diamino-benzidine comme chromogène (Dako, Glostrup, Denmark) : Pan-cytokeratine AE1/AE3 (clone PCK26, pre-dilué; Ventana Media Systems, Tucson, AZ ,USA); EMA (clone E29, pre-dilué; Ventana Media Systems, Tucson, Arizona ,USA); Protéine S100 (clone poly Z311, dilution 1:500; Dako, Glostrup, Danemark); AML (clone 1A4, dilution 1:12000; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA); desmine (clone DE-R-11, pre-dilué ; Ventana Media Systems, Tucson, Arizona USA) ; myogénine (clone LO 26, dilution 1:20; Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) ; MyoD1 (clone EP212, pre-dilué; Cell Marque, Rocklin, CA, USA); CD34 (clone QBEnd10, pre-dilué; Ventana, Tucson, AZ, USA); beta-caténine (clone 14, pre-dilué; Cell Marque, Rocklin, CA, USA); Ki 67 (clone 30-9, pre-dilué; Ventana Media Systems, Tucson, AZ ,USA); SOX10 (clone EP268, dilution 1:100; BioSB, Santa Barbara, CA, USA); H3K27Me3 (clone C36B11, dilution 1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) ; PAX3 (clone 274212, dilution 1 :100, RD Systems Europe, Lille, France). L'immunomarquage anti-H3K27Me3 a été évalué quantitativement selon le pourcentage de noyaux positifs dans les cellules tumorales (< 5 % : perte complète ; ≥ 5 et < 90 % : perte partielle ; ≥ 90 % : conservé). Un témoin positif interne a été analysé pour chaque cas (cellules endothéliales ou inflammatoires).

Pour l'anti-Ki 67, l'anti-myogénine, SOX10, MyoD1 et Béta-caténine, PAX3 et H3K27Me3, seul un marquage nucléaire a été considéré comme positif. Pour l'évaluation de la positivité de la bêta-caténine, un témoin positif externe a été utilisé (tumeur desmoïde). Lorsque que le marquage était positif dans plus de 5 % et strictement moins de 50 % des cellules tumorales, nous avons considéré qu'il s'agissait d'une « positivité focale » La positivité a été considérée comme diffuse si au moins 50 % des cellules tumorales étaient positives.

***Etude cytogénétique : Réarrangement du gène PAX3 par Hybridation in-situ fluorescente (FISH)**

L'hybridation in-situ fluorescente a été réalisée à partir de lames blanches de 4 micromètres selon le protocole décrit dans la littérature (5), à partir de sondes de type break-apart spécifiques des gènes suivants : PAX3, FOXO1, NCOA2 et WWTR1. Les références des sondes utilisées étaient les suivantes : WWTR1 : ZytoLight SPEC WWTR1 Dual Color Break Apart Probe, zytovision, réf : Z-2212-50 ; FOXO1 : ZytoLight SPEC FOXO1 Dual Color Break Apart Probe, zytovision, réf : Z-2139-50 ; NCOA2: NCOA2 BreakApart probe, Empire genomics, EG-NCOA2BA-20-ORGR.

***Extraction d'ARN :**

Pour l'extraction d'ARN, les zones riches en cellules tumorales ont été cerclées sur l'HES et repérées sur le bloc de paraffine. Le bloc a été foré avec un trocart, et les carottes obtenues ont été déparaffinées par deux bains de toluène suivis de deux bains d'éthanol absolu. Les échantillons ont incubé pendant 3 jours à 55°C dans 250 µL de tampon ATL (Qiagen, Courtaboeuf, France) auquel a été ajoutée de la protéinase K (concentration finale de 4mg/mL). L'ARN total a ensuite été extrait avec 750 µL de Trizol-LS (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) pour 250 µL de lysat cellulaire. La solution a ensuite été placée dans des conditions de centrifugation modérée pour 30 minutes à 1 heure, et l'ARN a été extrait selon les instructions du kit (Qiagen Courtaboeuf, France). Pour retirer les éventuelles contaminations par de l'ADN, l'ARN extrait a été re-suspendu dans 10 µL d'eau « RNase-free » et incubé avec le Mix 1X (Promega, Madison WI, USA), dithioeritol 1mM (Roche), Rnasin 40U (Promega, Madison WI, USA) et DNase 2U (Promega, Madison WI, USA) pendant 1 heure à 42°C. Enfin, l'ARN a été purifié à nouveau avec du Trizol-LS. L'ARN total obtenu a été quantifié avec le spectrophotomètre NanoDrop (Thermofisher Scientific).

***Etude moléculaire : détection par RT-PCR en temps réel des transcrits de fusion PAX3-MAML3, PAX3-FOXO1, PAX3-WWTR1, PAX3-NCOA2.**

La réaction de transcription inverse a été réalisée à partir de 5 µg d'ARN dans un volume de 20 µL contenant 50 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 40 mM de KCl, 5 mM de

MgCl₂, 0,5% Tween, 0,5 mM de mix dNTP, 10 mM de dithiothreitol (Roche Diagnostics, Meylan, France), les amorces anti-sens spécifiques (75 ng MAML3/NCOA1/FOXO1 amorce reverse ou 20 ng *béta-2 microglobuline* amorce reverse), 12 U de RNasin (Promega, Madison, WI), et 10 U de Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les échantillons ont été incubés à 42°C pendant 1 h, puis à 95°C pendant 5 min. L'amplification par PCR a été effectuée dans des plaques de 96 puits (Applied Biosystems, Foster City, CA), dans un mélange final de 25 µL contenant : 4 µL du produit de RT-PCR, 300 nM de chaque amorce, 100 nM de sonde Taqman *PAX* ou 50 nM de sonde *béta-2 microglobuline* doublement marquée, 200 µM d'un mélange de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP, 6 mM MgCl₂, 1,25 U de Taq polymérase et 0,25 U d'Ampérase UNG dans un tampon contenant une référence passive (fluorochrome Rox). Le paramétrage du thermocycleur était le suivant : 2 minutes à 50°C pour l'activation de l'ampérase, 10 minutes à 95°C pour l'activation de la Taq polymérase, puis 50 cycles de deux étapes de PCR consistant en 30 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Toutes les réactions ont été réalisées dans l'appareil ABI Prism 7500 Sequence Detection System (ThermoFisher).

Les séquences des sondes Taqman et des amorces (**Tableau 4**) ont été choisies à l'aide du logiciel "Primer Express" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les amorces ont été commandées chez Eurobio (Les Ulis, France), et les sondes ainsi que le kit QPCR Core auprès d'Eurogentec (Herstal, Belgium).

Tableau 4 : Séquences des amorces et sondes pour les RT-PCR

PAX3/MAML3

PAX3m+ 5'-TTTCCAGCTATACAGACAGCTTTG-3'

MAML3- 5'-TCCTTCCAACCTCCTTTTCACAGT-3'

Sonde 5'-FAM-AACCCCACCATTGGCAATGGCCT-TAMRA-3'

PAX3/FOXO1

PAX3m+ 5' -TTG GCA ATG GCC TCT CAC C-3'

FOXO1- 5'-ATC CAC CAA GAA CTT TTT CCA G-3'

Sonde 5' -TET-CCCTAC ACA GCA AGT TCA TTC GTG TGC AG-TAMRA-3'

PAX3/WWTR1

PAX3m+ 5'-GACCCTGTCACAGGCTAC-3'

WWTR1- 5'-TCTGCTGGCTCAGGGTACT-3'

WWTR1+ 5'-CACACCAGTGCCTCAGAG-3'

PAX3- 5'-CGTGTTCAAAAGGATTTGAAACC- 3'

PAX3/NCOA2

PAX3m+ 5' CTTTGTGCCTCCGTCGGG 3'

NCOA2- 5' CTCGTGTCTGGGAAAAGCTG 3'

Contrôle de PCR

BETA2M+ 5'-TGACTTTGTCACAGCCCAAGATA-3'

BETA2M- 5'-AATCCAAATGCGGCATCTTC-3'

BETA2M 5'-FAM-TGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCA-TAMRA-3'

Pour déterminer la positivité d'une PCR, nous avons observé le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR devient détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil, dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold), est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Un delta de Ct a été calculé, correspondant à la différence de Ct entre l'amplification du transcrite et l'amplification du transcrite bêta-2-microglobuline, utilisé comme contrôle. Les résultats étaient considérés comme interprétables si la valeur Ct correspondant à l'amplification du contrôle bêta-2- microglobuline était inférieure à 26.

***RNA-sequencing et analyse bioinformatique des données de NGS**

Pour l'enrichissement de l'ARN poly-A et la préparation de la librairie, 100 ng d'ARN total ont été utilisés. La construction des librairies a été réalisée selon le protocole TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina, San Diego, USA). Les librairies ont été réparties en groupe de 12 échantillons. Le séquençage a été réalisé sur la plateforme Illumina NextSeq 500 avec le kit NextSeq 500/550 High Output V2 (150 cycles).

Les données de séquençage (65 millions de reads par échantillon en moyenne) ont été alignés avec l'outil de traitement de données STAR sur le génome de référence GRCh 38.

Pour la caractérisation de nouveaux gènes de fusion, les reads séquencés ont été comparés au génome de référence grâce aux logiciels STAR Fusion, FusionMap, FusionCatcher, ERICSCRIPT et TopHat-fusion. Le gène de fusion caractérisé a été validé par au moins deux algorithmes (66, 67).

2-Résultats

a- Caractéristiques clinico-pathologiques du BSNS :

Les caractéristiques cliniques des patients ainsi que les données de suivi sont résumées dans le **Tableau 5**. Parmi les 41 cas de la série, 16 étaient de sexe masculin (39%), et 25 de sexe féminin (61%). La moyenne et la médiane de l'âge au diagnostic étaient respectivement de 52.2 et 49 ans (allant de 25 à 84 ans). La localisation de la tumeur initiale était le plus souvent la cavité nasale (28/41, 68 %) ou l'ethmoïde (20/41, 49 %), parmi lesquels certains atteignaient à la fois la cavité nasale et l'ethmoïde (11/41, 27 %). Une infiltration tumorale macroscopique de tissus osseux de voisinage était présente dans 15 % des cas (6/41). La taille de la tumeur initiale a été communiquée ou était évaluable chez 17 patients et s'étendait de 1 à 9 cm (taille médiane : 3.5 cm). Le diagnostic porté initialement était : un schwannome cellulaire (6/41), un synoviosarcome (1/41), une tumeur maligne des nerfs périphériques (MPNST) de bas grade (13/41) dont 5 de type tumeur de Triton maligne, ou un fibrosarcome de bas grade (3/41). Enfin, pour les 17 cas restants, les plus récents, le diagnostic de BSNS avait été porté initialement. Le reclassement en BSNS était fondé sur des données morphologiques et immunohistochimiques, conformément à l'article de référence (25). Les données de suivi clinique ont pu être collectées pour 25 patients de la série. La durée du suivi allait de 11 mois à 185 mois (médiane 45 mois).

Une récurrence locale du sarcome a été relevée chez 8 patients sur 25 (32 %), survenue entre 9 et 95 mois à compter du début de suivi. La majorité des patients a été traitée par exérèse chirurgicale de la tumeur (29/30 ; 97 %). Une approche endoscopique était préférée la plupart du temps. Chez 7 patients sur 30 (27 %), le traitement chirurgical était suivi d'une radiothérapie adjuvante, ou plus rarement d'une chimiothérapie adjuvante (2/30). Les cas de récurrence locale survenaient plus fréquemment chez des patients n'ayant pas subi de traitement adjuvant.

A la dernière date de suivi, 18 patients sur 26 (soit 69 %) étaient vivants sans notion de récurrence du sarcome. Un patient est décédé des suites d'un accident vasculaire pendant la chirurgie. Quatre patients étaient vivants, sans données connues sur l'évolution de la maladie. Enfin, trois patients étaient vivants en présence d'un résidu tumoral (patients inopérables). Aucun patient de l'étude n'a présenté de métastase à distance.

Tableau 5 : Caractérisation anatomo-clinique du sarcome sinonasal biphénotypique

	N (%)	N total analysés
Age moyen/médian (années)	52,2/49	41
Age min-max (années)	25-84	41
Genre		41
<i>F</i>	25(61%)	
<i>M</i>	16(39%)	
Localisation		41
<i>Cavité nasale</i>	28(68%)	
<i>Ethmoïde</i>	20(49%)	
<i>Cavité nasale et ethmoïde</i>	11(27%)	
<i>Sinus nos</i>	7 (17 %)	
Taille tumorale médiane (sd), cm	3.5(1,9)	17
Infiltration osseuse macroscopique <i>(orbite/base du crâne)</i>	6 (15%)	41
<u>Analyse morphologique</u>		
<i>Noyaux ondulés</i>	7 (17 %)	40
<i>Différenciation rhabdomyoblastique</i>	5 (12 %)	40
<i>Activité mitotique < 5/10 HPF</i>	39(95%)	41
<i>Vascularisation hémangiopéricytaire focale</i>	33(80%)	41
<i>Prolifération épithéliale bénigne</i>	25(62%)	40

Infiltration osseuse de voisinage	19(57%)	33*
--	---------	-----

<u>Traitement</u>		30
--------------------------	--	----

<i>Chirurgie, dont :</i>	29(97%)	
---------------------------------	---------	--

° <i>Chirurgie seule</i>	18	
--------------------------	----	--

° <i>Chirurgie + Radiothérapie adju.</i>	7	
--	---	--

° <i>Chimiothérapie néo-adju + Chirurgie + Radiothérapie</i>	2	
--	---	--

° <i>Chirurgie + Chimiothérapie adju.</i>	2	
---	---	--

<i>Chimiothérapie + Radiothérapie</i>	1	
--	---	--

<u>Récidive locale</u>	8 (32 %)	25
-------------------------------	----------	----

Délai moyen de récidive (mois)	40 mois	
---------------------------------------	---------	--

Intervalle de survenue de récidive (mois)	9 à 95	
--	--------	--

<u>Statut aux dernières nouvelles</u>		26
--	--	----

<i>VSM</i>	18(69%)	
-------------------	---------	--

<i>DAM</i>	1	
-------------------	---	--

<i>VAM</i>	3	
-------------------	---	--

<i>VNS</i>	4	
-------------------	---	--

Durée de suivi (mois)	11–185	25
------------------------------	--------	----

Durée médiane de suivi (mois)	45	
--------------------------------------	----	--

<u>Diagnostic initial</u>		41
----------------------------------	--	----

<i>MPNST</i>	8	
---------------------	---	--

<i>Schwannome cellulaire</i>	6	
-------------------------------------	---	--

<i>Synovialosarcome</i>	1	
--------------------------------	---	--

<i>Neurofibrome</i>	1	
----------------------------	---	--

<i>Tumeur de Triton maligne</i>	5	
--	---	--

<i>Fibrosarcome</i>	3	
----------------------------	---	--

<i>BSNS</i>	17	
--------------------	----	--

Abréviations : ns, non spécifié ; DAM, Décès d'une autre maladie ; VSM, vivant sans sarcome résiduel ;

VAM, vivant avec sarcome résiduel ; VNS, vivant statut non spécifié ; sd, standard deviation; F, féminin; M, masculin;

*33 échantillons sur 41 contenaient des fragments osseux analysables.

b- Analyse morphologique du BSNS :

L'ensemble des 41 cas de la série montrait un ensemble de caractéristiques morphologiques communes à l'examen microscopique : il s'agissait toujours d'une tumeur mal limitée, infiltrante, atteignant souvent les tissus osseux ou cartilagineux de voisinage (19/33, 57 %). L'orbite et la base du crâne étaient infiltrés chez 2 patients. La prolifération tumorale était densément cellulaire, organisée en faisceaux moyens à longs de cellules fusiformes monomorphes, avec parfois un aspect en chevrons ou « en arêtes de poissons ». (**Figures 3a, 3b et 3d**). Les cellules tumorales contenaient un noyau ovalaire, monomorphe, modérément atypique et à chromatine finement granuleuse (Figure 3c). Le cytoplasme était peu abondant, souvent à limites floues. Dans certains cas, nous avons observé un noyau d'aspect ondulé, rappelant une différenciation nerveuse de la tumeur (7/40, 17 %, **Figure 3f**). Par ailleurs, 5 cas (12 %) montraient une différenciation rhabdomyoblastique caractérisée par des cellules d'aspect plus globuleux à cytoplasme éosinophile, ou plus rarement avec des striations focales (**Figures 3g et 3h**). Il n'a pas été observé de cellules tumorales pléomorphes. Le stroma tumoral était le plus souvent constitué de fibres de collagène peu à moyennement dense. Dans 7 cas (17 %), des remaniements myxoides ont été observés. Une vascularisation hémangiopéricytaire péri-tumorale, sans hyalinisation péri-vasculaire, était présente focalement dans 33 cas (80 %). Une prolifération épithéliale bénigne sous la forme d'une invagination glandulaire était retrouvée dans la plupart des cas (25/40, 62 %). (**Figure 3e**). La nécrose était toujours absente. Enfin, l'activité mitotique était très faible (< 5/ 10 HPF) dans la plupart des cas (39/41 ; 95 %). Deux cas montraient une activité mitotique augmentée (respectivement 9 et 12 mitoses /10 HPF), mais ne montraient pas de particularité clinique, immunohistochimique ou moléculaire.

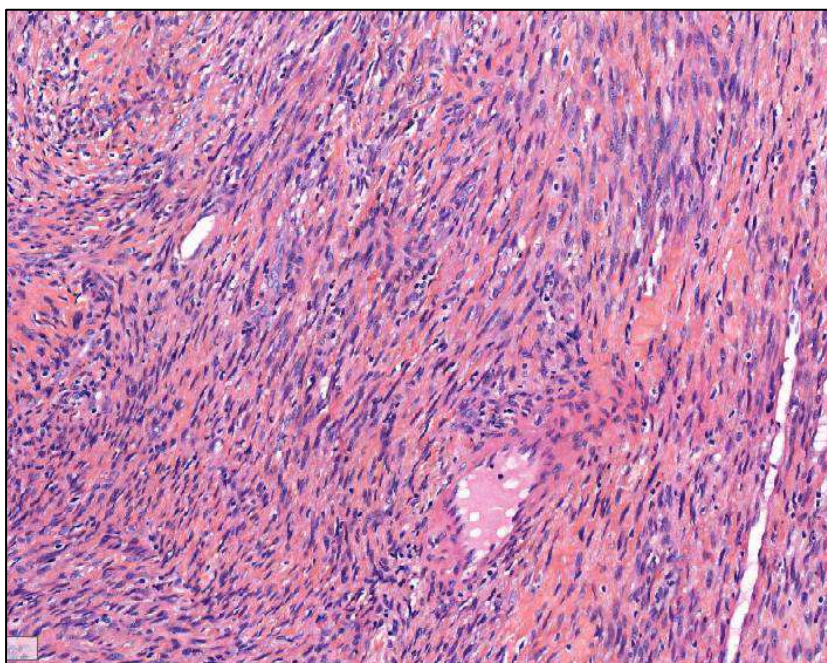


Figure 3a : HES X4, architecture fasciculée

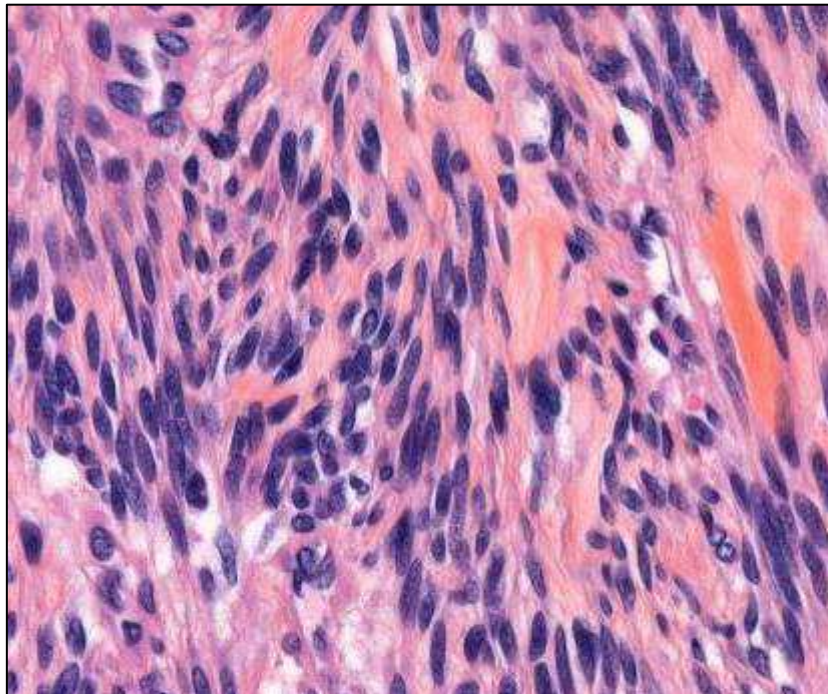


Figure 3b : HES X10, faisceaux de cellules fusiformes

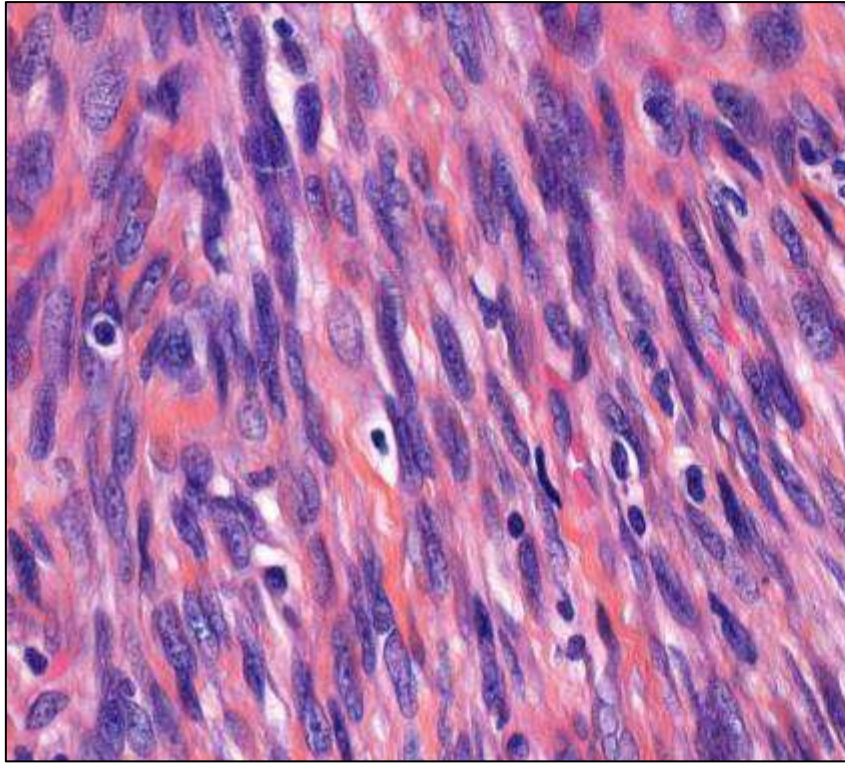


Figure 3c : HES X20, noyaux ovales peu atypiques

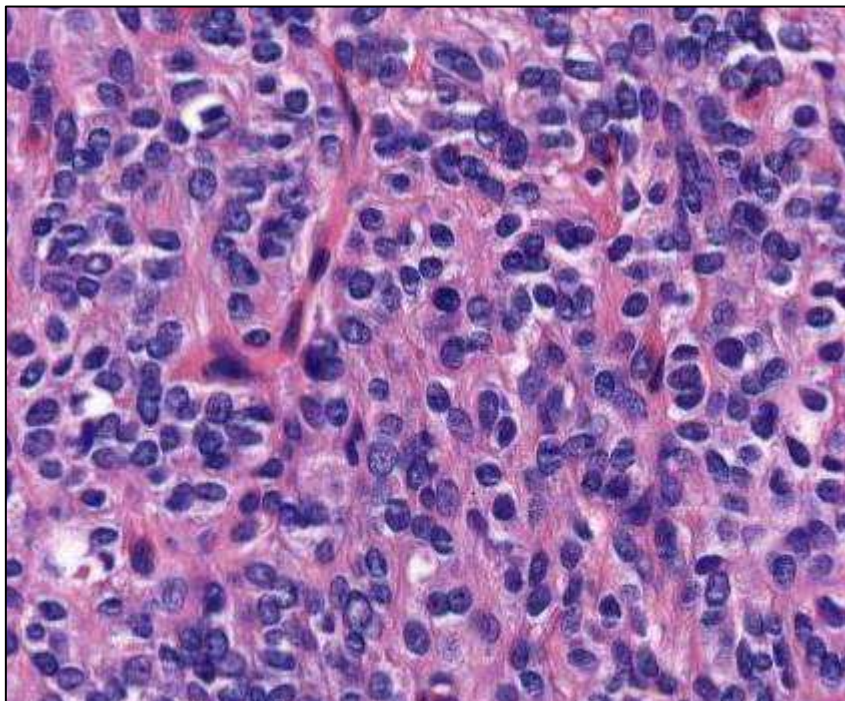


Figure 3d : HES X10

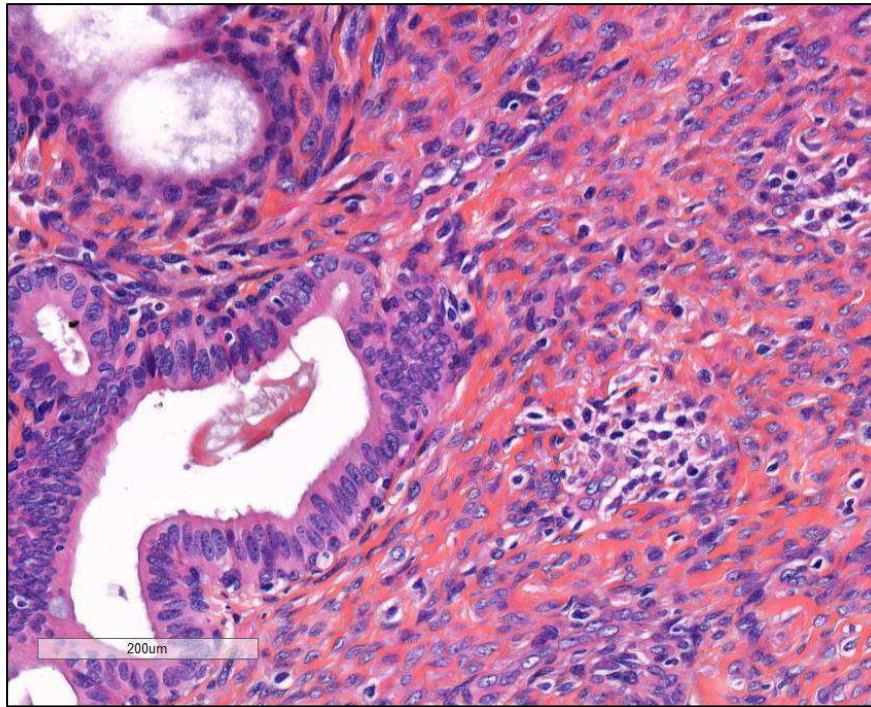


Figure 3e : HES X4, invagination glandulaire bénigne

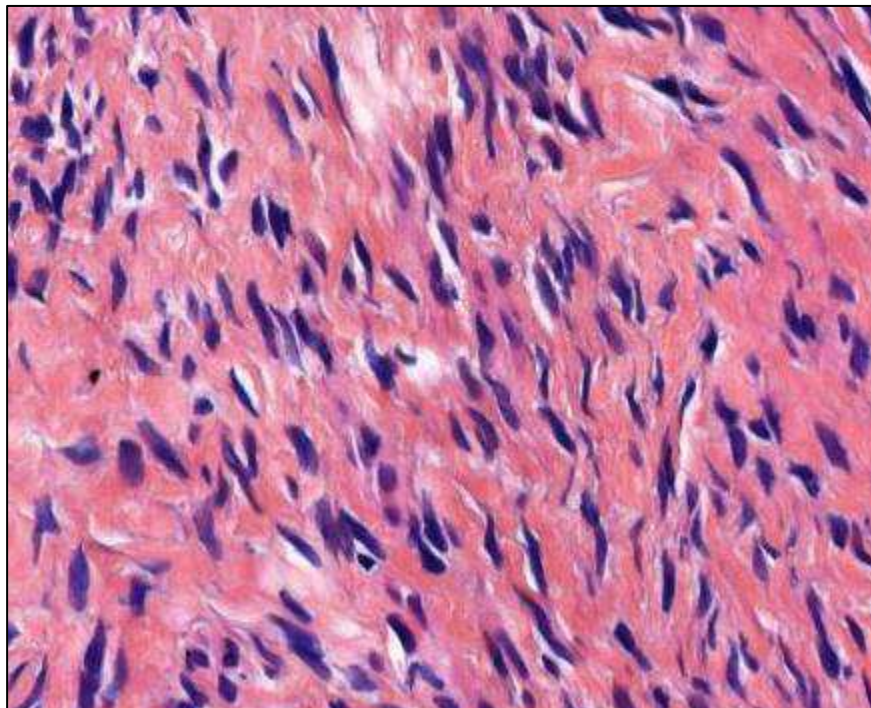


Figure 3f : HES X10, noyaux ondulés

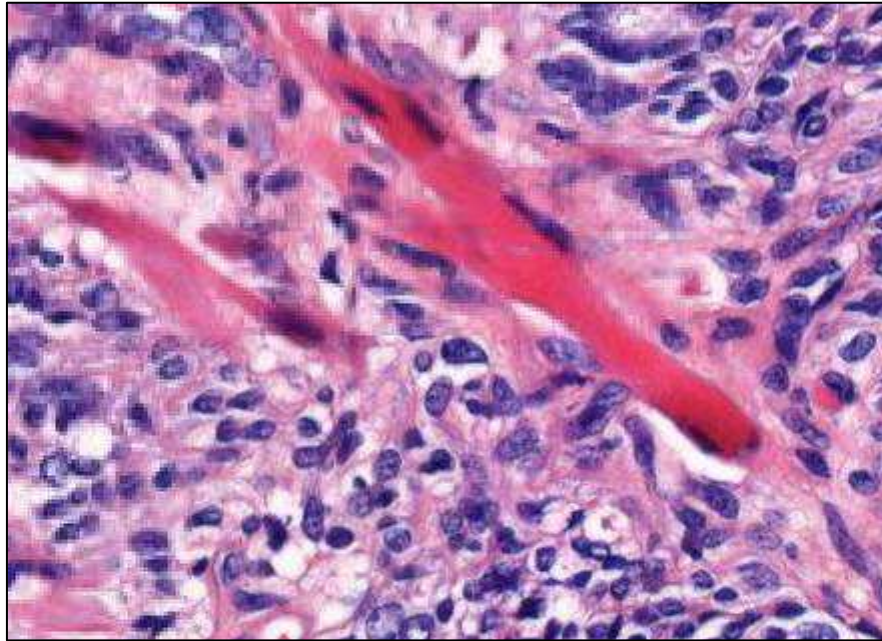


Figure 3g : HES X10 : différenciation rhabdomyoblastique

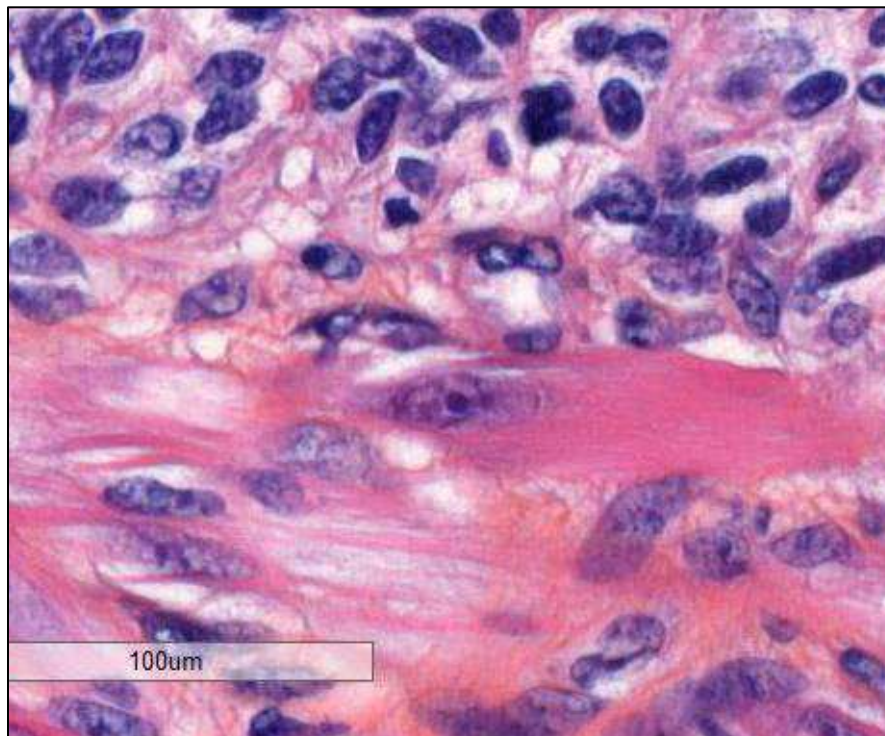


Figure 3h : HES X20, striations focales

c- Caractéristiques immunohistochimiques du BSNS :

Les résultats de l'analyse immunohistochimique sont présentés dans le **Tableau 6** et illustrés sur la Figure 2. Les 41 cas de la série (100%) exprimaient l'anti-S100, avec un pattern et une intensité de marquage variables, focal (56 %) ou diffus (44 %), faible à intense (**Figure 4a**). L'AML était positive dans 90 % des cas, le plus souvent focalement. Une positivité de la desmine, focale ou sur cellules isolées, a été détectée dans 66% des cas (**Figure 4c**). 8 cas parmi ces derniers étaient également positifs pour la myogénine (20 %), mettant ainsi en évidence une différenciation musculaire striée (**Figure 4d**). La positivité pour l'anti MyoD1, majoritairement focale, était observée dans 91 % des 35 cas analysés pour cet anticorps (**Figure 4b**). L'EMA était focalement positive dans 11 % des cas. Cinq d'entre eux étaient également positifs pour l'anti panCK AE1-AE3 (11 %). 3 cas sur 40 (10 %) montraient de rares cellules positives pour l'anti CD34. Tous les cas analysés (35/35) étaient négatifs pour le SOX10.

Un marquage nucléaire hétérogène avec l'anticorps anti-H3K27Me3, considéré comme une perte partielle, a été observé dans 67 % des 30 cas analysés (médiane : marquage de 65 % des cellules tumorales). Les autres cas (33 %) montraient un marquage conservé. Aucun des cas de la série n'a montré de perte complète de l'anti-H3K27Me3. Une positivité nucléaire de la bêta-caténine a été mise en évidence dans 27 % des 22 cas analysés. L'anticorps anti-PAX 3 était positif sur les 29 cas analysés, parmi lesquels 21 montraient une positivité diffuse (14 d'intensité forte et 7 d'intensité faible), et 8 une positivité focale (2 d'intensité forte et 6 d'intensité faible).

Enfin, l'index de prolifération Ki67 était majoritairement bas ($\leq 10\%$), dans 90 % des 38 cas analysés. Les cas ayant un index Ki 67 plus élevé ($> 10\%$) ne montraient pas de particularité phénotypique.

Tableau 6 : Profil immunohistochimique du sarcome sinonasal biphénotypique

	Pos (%)	Pos diffus (%)	Pos focal (%)	N total analysés
S100	100	44	56	41
MyoD1	91	6	77	35
SOX10	0	0	0	34
AML	90	33	57	40
desmine	66	0	37	41
myogenine	20	0	20	40
PAX3	100	72	28	29
CD34	10	0	10	40
PanCK AE1-				
AE3	11	0	11	38
Beta				
catenine	27	0	27	22
EMA	11	0	11	36
		Perte partielle	Perte complète	N total analysés
H3K27Me3	Conservé			
%	33	67	0	30
			N total analysés	
Ki67	≤ 10 %	> 10 %		
%	90	10	38	

Abréviations : N total analysés, nombre total de cas analysés ; Pos, positif

Pos focal, positivité focale ; conservé : ≥ 95 % ; perte complète : < 5 %

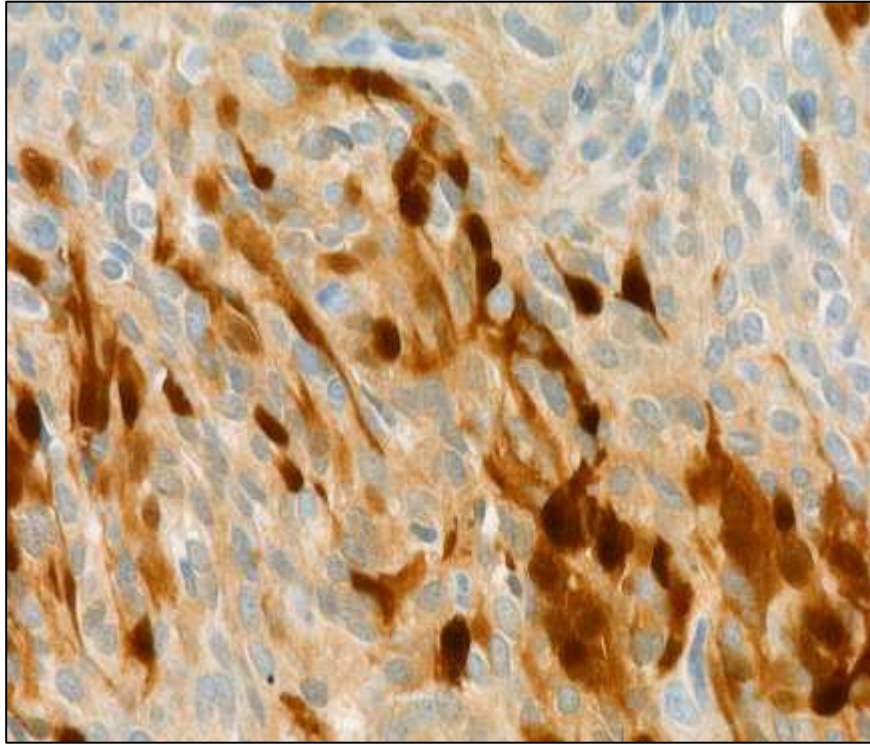


Figure 4a : anti-PS100, X10

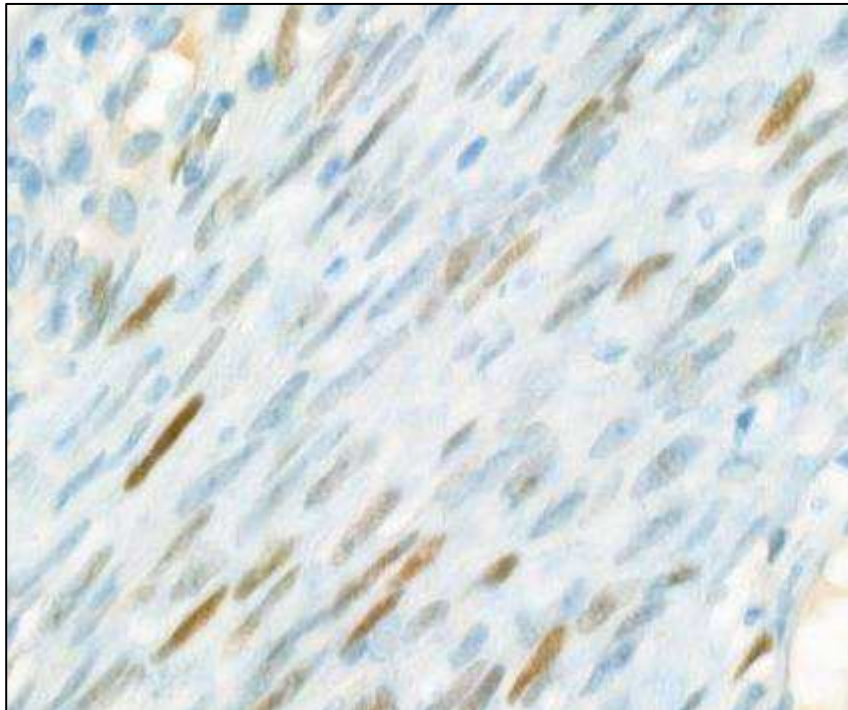


Figure 4b : anti- MyoD1, X10

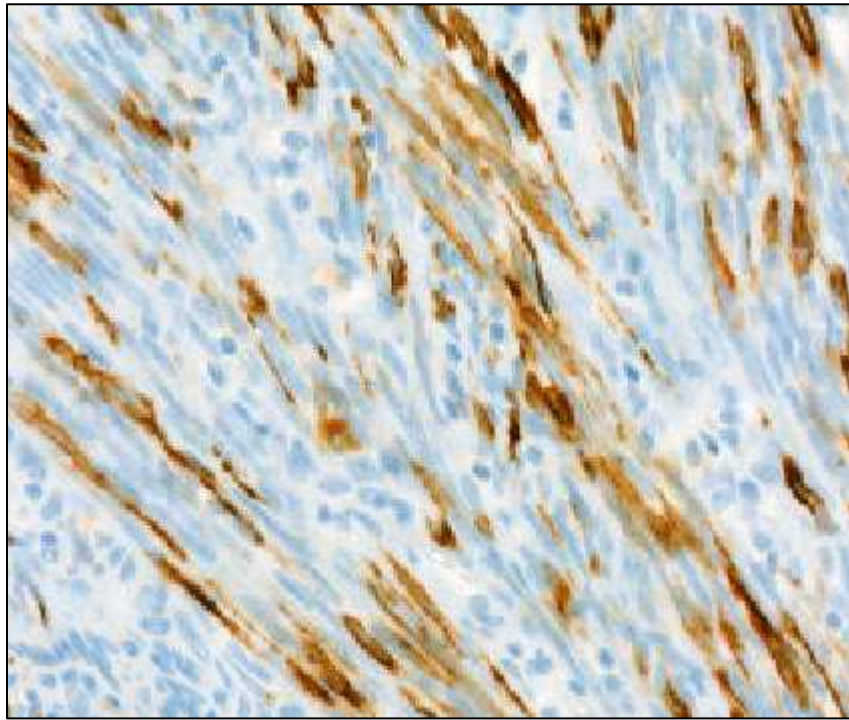


Figure 4c : anti-desmine, X10

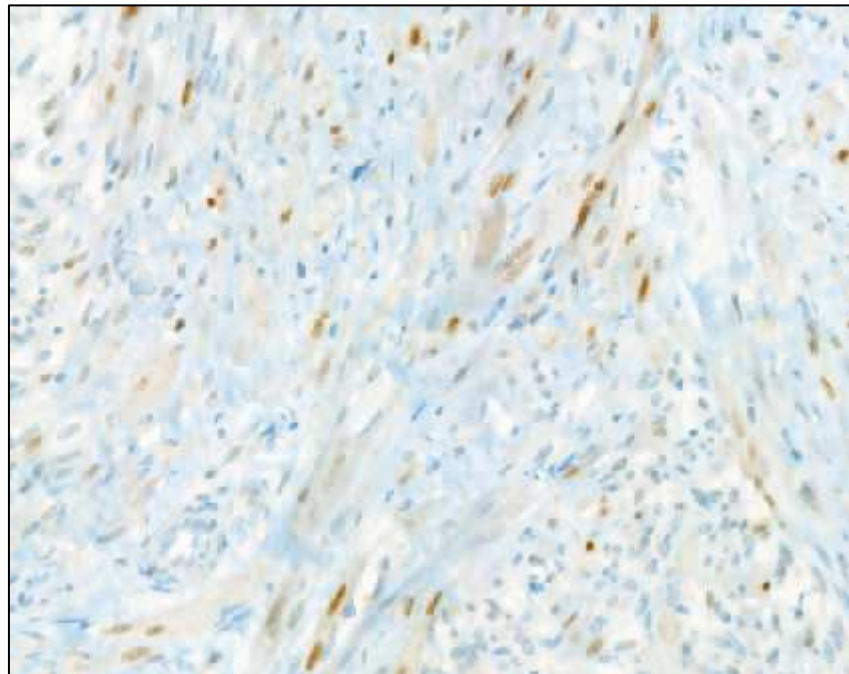


Figure 4d : anti-myogénine, X4

d- Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires du BSNS :

Les résultats des analyses moléculaires sont résumés dans le **Tableau 7**. Parmi les 41 cas de la série analysables (3 cas exclus en raison d'un ADN dégradé), 37 cas (90.2 %) étaient caractérisés par la translocation canonique t(2;4)(q35;q31.1) correspondant au gène de fusion PAX3-MAML3, dont 35 analysés par RT-PCR et 2 par FISH break apart avec les sondes PAX3 et MAML3. Un autre cas (cas 40 ; 2.4 %) présentait la translocation alternative **PAX3-FOXO1**, validée par FISH et RT-PCR. Les 3 autres cas étaient positifs en FISH PAX3 mais négatifs avec les sondes spécifiques des partenaires alternatifs de PAX3 déjà rapportés dans la littérature, à savoir MAML3, FOXO1 ou NCOA1.

Afin de caractériser d'éventuels nouveaux transcrits de fusion, une analyse par RNA-seq a été réalisée sur ces 3 cas de BSNS caractérisés par une translocation PAX3-X. L'analyse bioinformatique des données de séquençage a permis de caractériser deux nouveaux transcrits de fusion : **PAX3-NCOA2** résultant de la translocation entre l'exon 7 de PAX3 et l'exon 12 de NCOA2 pour l'un des cas (cas 5 ; 2.4%), et **PAX3-WWTR1** résultant de la translocation entre l'exon 8 de PAX3 et l'exon 5 de WWTR1 pour les 2 autres cas (cas 8 et 29 ; 5 %), confirmés par FISH et RT-PCR.

Tableau 7 : Caractérisation moléculaire du sarcome sinonasal biphénotypique

	N	%
PAX3-MAML3 + dont :	37	90,2
<i>RTPCR PAX3-MAML3 +</i>	35	85
<i>FISH PAX3 + et FISH MAML3 +</i>	2	5
PAX3-NCOA2 + (RNAseq)*	1	2,4
PAX3-WWTR1 + (RNAseq ; FISH PAX3 + ; FISH WWTR1 +)*	2	5
PAX3-FOXO1 + (RTPCR)	1	2,4
N total analysés	41	100

*FISH MAML3 /NCOA1/FOXO1 - ; RTPCR PAX3-MAML3 - ; RTPCR PAX3-NCOA1-

3-Discussion :

a- Données anatomo-cliniques : similitudes

Notre étude a porté sur une série de 41 cas, ce qui en fait l'une des deux plus grandes séries de BSNS publiées à l'heure actuelle. Elle confirme en grande partie les données anatomo-cliniques rapportées dans la littérature jusqu'à présent et met tout particulièrement l'accent sur le suivi clinique des patients atteints. Le BSNS touche le plus souvent les femmes d'âge moyen (ratio, 1.6 : 1 ; moyenne, 52.2 ans) et atteint de préférence la cavité nasale et l'ethmoïde (83 %). Contrairement aux sarcomes de type rhabdomyosarcome ou MPNST – deux de ses principaux diagnostics différentiels -, il s'agit d'une tumeur plutôt indolente, pour laquelle aucune métastase à distance n'a été rapportée. Deux cas de décès ont été rapportés dans la littérature (5, 40), associés à une importante extension tumorale intra-crânienne. Cependant, le BSNS est localement agressif : une infiltration tumorale du tissu osseux ou cartilagineux de voisinage a été observée dans plus de 50 % des cas. De plus, les récurrences locales sont fréquentes (32 %).

A l'examen microscopique, nous retrouvons l'aspect caractéristique du BSNS : il s'agit d'une prolifération tumorale densément cellulaire, constituée de faisceaux de cellules fusiformes monomorphes, à noyaux ovalaires modérément atypiques et à l'activité mitotique faible. Focalement et dans un petit nombre de cas, il est possible d'observer une différenciation nerveuse (noyaux ondulés) et/ou une différenciation rhabdomyoblastique (cytoplasme éosinophile, striations focales). Le stroma péri-tumoral est peu à moyennement collagène et indemne de nécrose. De manière récurrente, la prolifération sarcomateuse est intriquée à une prolifération épithéliale bénigne (65 %).

b- Données IHC : similitudes, différences et nouveautés

Nous avons par ailleurs réalisé un panel large de marqueurs immunohistochimiques, comprenant d'une part les anticorps utilisés le plus souvent dans la littérature pour le diagnostic de BSNS - à savoir la PS100, l'AML, la desmine, la myogénine, le SOX10 et le Ki67, et d'autre part un panel d'anticorps complémentaires dont les résultats étaient absents ou nous paraissaient peu probants dans la littérature (trop faible nombre de cas analysés, résultats contradictoires selon les séries) : la Béta catenine, le MyoD1, le PAX 3 et l'anticorps H3K27Me3.

*En accord avec les dernières publications, le profil immunohistochimique du BSNS dans notre série se caractérise par une positivité de la PS100 (100 % des cas) et d'au moins un marqueur musculaire (91 % MyoD1 +, 66 % desmine +, 90% AML +). Néanmoins, contrairement aux résultats publiés dans la littérature, l'anticorps anti-MyoD1 est le marqueur musculaire le plus fréquemment positif dans notre série (91.4 % des cas), nettement supérieur aux taux de 18 % (4 cas positifs sur 22 analysés) et 25 % (11/44) rapportés respectivement par Wang et al. en 2014 (43) et Fritchie et al. en 2016 (15).

Notre résultat est d'ailleurs en accord avec le profil d'expression publié par Wang et al. sur 8 cas de BSNS et dans lequel le MyoD1 est l'un des 150 gènes les plus exprimés dans le BSNS. Les taux de positivité différents de l'anti-MyoD1 dans notre étude et dans la littérature peuvent s'expliquer en partie par l'utilisation de clones différents (clone 5.8 A dans l'étude de Wang, clone EP212 dans notre étude). De même, nous trouvons un taux de positivité de la myogénine, témoin d'une différenciation musculaire striée, d'environ 20 % alors qu'il varie de 9 à 12 % dans les études déjà

publiées (6, 15). Dans notre série, la positivité de la myogénine est observée dans une partie des cas PAX3-MAML3+, dans le cas PAX3-NCOA2 + et dans l'un des cas PAX3-WWTR1 +. Il semble donc que la positivité de la myogénine ne soit pas associée à un type particulier d'anomalie moléculaire dans le BSNS.

Concernant les marqueurs musculaires, le MyoD1, plus spécifique que l'AML, et plus sensible que la myogénine, apparaît donc dans notre étude comme le marqueur musculaire de choix pour le diagnostic de BSNS et la mise en évidence d'une différenciation musculaire striée dans le BSNS.

*En accord avec la publication récente de Jo VY et al., nous avons également analysé la positivité de l'anticorps anti-PAX3 dans notre série. Nous confirmons la positivité de ce marqueur dans la totalité des cas testés (29), mais avec une intensité faible et/ou un marquage seulement focal dans environ la moitié des cas.

*L'analyse de l'anticorps anti-Béta caténine a fait l'objet de plusieurs études (4) (5) qui rapportent un taux de positivité nucléaire variant de 80 à 90 % (analyses réalisées sur une vingtaine de cas de BSNS). Au contraire, dans notre série, nous avons observé une **positivité nucléaire de la béta-caténine dans seulement 27 % des 22 cas analysés**. Compte-tenu de ce résultat et de la faible spécificité de la béta-caténine - positive également dans de nombreuses autres tumeurs des tissus mous à cellules fusiformes, en particulier l'hémangiopéricytome sinonasal-, et même si un rôle de la voie Wnt dans l'oncogenèse du BSNS ne peut être exclu, **la Béta-caténine n'apparaît pas être un outil diagnostique déterminant pour le diagnostic de BSNS. D'autres études sont cependant nécessaires pour évaluer l'expression de ce marqueur dans le BSNS.**

*Le SOX10 est normalement exprimé dans les cellules de Schwann, les mélanocytes et les cellules myoépithéliales. C'est un marqueur sensible et spécifique d'une différenciation nerveuse. Il est positif dans de nombreuses tumeurs à différenciation nerveuse, comme les schwannomes (90 à 100 %), les MPNST et les tumeurs de Triton malignes (50 à 70 %) (10). Dans notre série et conformément aux publications antérieures, tous les cas de BSNS étaient négatifs pour **le SOX10. Il s'agit donc d'un outil diagnostique complémentaire intéressant pour le diagnostic différentiel entre les BSNS d'une part et les schwannomes cellulaire, MPNST et Tumeurs de Triton malignes d'autre part.**

* Enfin, plusieurs études récentes ont mis en évidence, dans une part importante de MPNST et Tumeur de Triton maligne, une perte complète du marquage immunohistochimique par l'anticorps anti-H3K27Me3, correspondant à une perte de triméthylation au niveau de la lysine 27 de l'histone H3. Cette altération épigénétique aurait pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire et participerait à la tumorigenèse. Selon plusieurs études récentes (19, 20, 21, 48, 50), 44 à 49 % des MPNST montrent ainsi une perte complète de l'anti-H3K27Me3. De même, 95 % des tumeurs de Triton malignes (21/22 analysées au sein d'une série de 122 MPNST) montrent une perte complète de cet anticorps (21). Dans notre étude, nous avons donc voulu évaluer le rôle de l'anticorps anti-H3K27Me3 comme éventuel marqueur diagnostique dans le BSNS. La majorité des cas analysés montre une perte partielle du marquage (67 %), alors que le marquage est conservé dans un tiers des cas (33%). Aucun cas de notre série ne montre une perte complète de triméthylation de H3K27. En conséquence, nous pensons que, dans certains cas de diagnostic difficile, **l'utilisation de l'anticorps H3K27Me3, en complément du SOX10, peut s'avérer utile pour différencier un BSNS d'une tumeur de Triton, d'une MPNST ou d'un schwannome cellulaire.**

*En conclusion, le plus souvent, le diagnostic de BSNS sera posé à partir des critères suivants, non équivoques : la localisation anatomique, l'aspect microscopique caractéristique et la positivité de la S100. D'autres marqueurs immunohistochimiques complémentaires comme le MyoD1, la desmine, la myogénine, le SOX10 ou le H3K27Me3 pourront être réalisés dans un second temps.

Néanmoins, en cas de diagnostic difficile, en particulier sur microbiopsies, le recours aux analyses moléculaires peut s'avérer indispensable. L'existence d'une signature moléculaire spécifique et récurrente dans une majorité de BSNS rend cette approche particulièrement performante.

c- Données moléculaires : similitudes, différences et nouveautés

*La totalité des cas inclus dans notre série a fait l'objet d'une caractérisation moléculaire : ils sont tous caractérisés par un réarrangement du gène PAX 3. Ce facteur de transcription joue un rôle majeur dans la différenciation musculaire, nerveuse et mélanocytaire au cours de l'embryogénèse (34, 35, 57). Plus récemment, plusieurs études ont montré que PAX3 avait un rôle oncogénique dans de nombreux

cancers - dont les rhabdomyosarcomes -, dans la mesure où les gènes dont l'expression est régulée par PAX3 sont impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. (35, 60). En particulier, dans le BSNS, les translocations réciproques qui juxtaposent le domaine de liaison à l'ADN (ou « DNA binding domain ») de PAX 3 au domaine d'activation transcriptionnelle d'un autre facteur de transcription, entraînent une dérégulation de fonction de PAX3 et contribuent à la pathogénèse du sarcome (43, 60). Dans notre série, la translocation canonique PAX3-MAML3 est largement majoritaire (90 % des 41 cas analysés). Ce taux apparaît nettement supérieur à celui rapporté jusqu'à maintenant dans la littérature : il est de 55 % (24/44) dans l'autre grande série de BSNS (44 cas) publiée par Fritchie et al. en 2016 (15), et atteint en moyenne 58.6 % sur l'ensemble des cas publiés (6).

*Notre série comporte par ailleurs un seul cas positif (2.4 %) pour la translocation alternative PAX3-FOXO1 [t(2;13)(q35;q14)], déjà caractérisée dans de rares cas de BSNS (8 % des cas publiés entre 2015 et 2018 (6)). Compte tenu de la rareté de cette altération moléculaire dans le BSNS, ce résultat apparaît cohérent avec les publications antérieures et confirme que cette translocation alternative, que le BSNS partage avec 60 à 75 % des RMSA (62) reste assez exceptionnelle dans le BSNS.

*Par ailleurs, en réalisant une analyse transcriptomique par séquençage à haut débit (RNAseq) sur trois cas de notre série pour lesquels aucune des translocations publiées n'étaient retrouvées, **nous avons mis en évidence deux nouveaux transcrits de fusion alternatifs dans le BSNS**. L'un des cas est caractérisé par la **translocation PAX3-NCOA2**, entre l'exon 7 du chromosome 2 (PAX3) et l'exon 12 du chromosome 8 (NCOA2), (**Figure 5**). Il concerne une tumeur survenue au niveau de la cavité nasale chez une femme de 49 ans, initialement diagnostiquée comme une tumeur de Triton maligne. Il est intéressant de noter qu'il s'agit de l'un des rares cas de la série présentant des critères microscopiques de différenciation rhabdomyoblastique (cellules globuleuses et striations focales), ce que confirme la positivité focale de la myogénine. Tout comme les transcrits de fusion PAX3-NCOA1 et PAX3-FOXO1, PAX3-NCOA2 est aussi impliqué dans de rares cas de RMSA et de RMSE (36, 41, 42). Ce résultat souligne donc de nouveau que les mécanismes moléculaires à l'œuvre dans l'oncogenèse du BSNS et du RMS sont particulièrement proches, ces deux entités partageant d'ailleurs un même phénotype musculaire.

Enfin, notre série comporte deux cas caractérisés par la translocation t(2;1)(q36, p36) correspondant au transcrit de fusion PAX3-WWTR1. Tout comme les gènes de la

famille PAX, le coactivateur transcriptionnel TAZ, ou domaine WW, qui contient le régulateur transcriptionnel WWTR1, a un rôle bien connu dans l'embryogénèse, notamment la différenciation tissulaire osseuse, musculaire et adipeuse (1, 45). En particulier, des expérimentations réalisées *in vitro* ont montré que TAZ semblait accroître l'activité transcriptionnelle de PAX3 pendant l'embryogénèse (58). Depuis 2008, d'autres études ont mis en évidence le rôle de TAZ dans la tumorigénèse : en particulier, une surexpression de la protéine TAZ est observée dans de nombreux cancers, comme le cancer du sein invasif ou le glioblastome (45). Plus récemment, la translocation récurrente WWTR1-CAMTA1 t(1;3) (p36;q25) a été caractérisée dans l'hémangioendothéliome épithélioïde sinonasal (EHE), une tumeur vasculaire de potentiel de malignité incertain., très rare dans cette localisation (12). Le BSNS est donc le second exemple du rôle direct de WWTR1 dans le développement d'un cancer. De plus, Sun C et al. (69), ont montré récemment le rôle essentiel de YAP et WWTR1 dans la prolifération de myoblastes au stade précoce de la myogénèse : en particulier, WWTR1 régule de nombreux gènes impliqués dans la différenciation musculaire striée à partir des cellules souches musculaires, comme PAX7, Myf 5 ou MyoD1.

Dans notre série, les 2 cas de BSNS caractérisés par la translocation PAX3-WWTR1 concernaient un homme et une femme âgés respectivement de 76 et 65 ans. L'aspect morphologique et le profil immunohistochimique ne montraient pas de particularité, hormis une infiltration osseuse de voisinage et une positivité de la myogénine pour l'un des deux cas. Les deux patients ont subi un traitement par chirurgie seule : aucune récurrence locale n'a été rapportée à la date de fin du suivi.

Au final, l'analyse de l'ensemble des données moléculaires rapportées jusqu'à présent dans les différentes séries de BSNS (15, 5) n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation entre la nature du transcrite d'une part et les caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques ou cliniques d'autre part. A l'heure actuelle, compte tenu en particulier de la rareté de cette nouvelle entité, et donc du faible nombre de cas analysés, il est impossible d'associer un transcrite de fusion à une éventuelle meilleure réponse thérapeutique ou une moindre agressivité locale.

d- Discussion des principaux diagnostics différentiels

Notre étude s'ajoute donc aux publications antérieures dans le but d'obtenir une caractérisation de plus en plus précise et complète du BSNS. Ainsi, il devient possible d'établir un ensemble de critères diagnostiques robustes, capable de différencier le BSNS des nombreuses entités avec lesquelles il partage certaines caractéristiques morphologiques et/ou immunohistochimiques. Ils sont résumés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Principaux diagnostics différentiels du BSNS

Entités	Morphologie	Immunohistochimie	Biologie moléculaire
BSNS	Sarcome de bas grade à cellules fusiformes +/- différenciation musculaire striée et nerveuse. Pas de cellules pléomorphes. Pas de nécrose. Matrice collagène de densité moyenne.	PS100 + MyoD1 + / AML + Myogénine + (20%) SOX10 - H3K27Me3 + AE1-AE3 + focal (rarement)	t(PAX3-MAML3) t(PAX3-FOXO1) t(PAX3-NCOA1/2) t(PAX3-WWTR1)
MPNST / Triton maligne <i>Souvent associées à la NF1</i>	Cellules pléomorphes, souvent de haut grade, mitoses, atypies marquées, cellularité variable	PS100 + focal intense SOX10 + (50-70 %) H3K27Me3 - (70 %) Myogénine + (Triton)	
Schwannome	Cellules fusiformes,	PS100 + diffuse SOX10 +	

cellulaire	vaisseaux à paroi épaissie		
Fibrosarcome	Longs faisceaux de cellules fusiformes « en arêtes de poisson », matrice collagène dense.	AML - Desmine - myogénine - PS100 -	
Synovialosarcome	Sarcome à cellules fusiformes et monomorphes.	AE1-AE3 + focal <i>PS100 + (15-38 %)</i> <i>AML + (20 %)</i>	t(SYT-SSX1/SSX2)
Léiomyosarcome	Cytoplasme très éosinophile, noyaux en bouts de cigare	AML + Caldesmone + diffus	
TFS	Trousseaux de collagène Vaisseaux à paroi épaisse	Stat 6 + CD34 + PS100 -	
RMSA RMS à cellules fusiformes	Souvent de haut grade : mitoses, atypies marquées, cellules pléomorphes, nécrose, rhabdomyoblastes	PS100 – Myogenine +	PAX3-NCOA1 / NCOA2 PAX3-FOXO1 / AFX PAX7-FOXO1 SFR-NCOA2 / TEAD1-NCOA2
Mélanome à cellules fusiformes	Cellules fusiformes	PS100 + MelanA +	

C- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons décrit les caractéristiques anatomo-cliniques, immunohistochimiques et moléculaires d'une série de 41 cas de sarcome sinonasal biphénotypique. Par cette étude, nous enrichissons les données concernant cette nouvelle entité, en particulier s'agissant du suivi clinique des patients, encore peu analysé, et du profil immunohistochimique et moléculaire : bien qu'étant un sarcome de bas grade, dont l'exérèse chirurgicale est le plus souvent thérapeutique, le BSNS est agressif localement et présente un taux de récurrence locale relativement élevé. Concernant le profil immunohistochimique du BSNS, nous avons montré l'utilité de l'anticorps anti-MyoD1, plus spécifique que l'AML, ainsi que dans certains cas de diagnostic difficile des anticorps anti-H3K27Me3 et SOX10. Inversement, la bêta-caténine ne semble pas devoir faire partie du panel immunohistochimique de première intention en cas de suspicion de BSNS. Enfin, une analyse génétique étendue, réalisée sur l'ensemble des cas de la série, nous a permis de caractériser deux nouveaux transcrits de fusion alternatifs - PAX3-NCOA2 et PAX3-WWTR1 - à la translocation canonique PAX3-MAML3. Par la suite, il pourra être intéressant de constituer de nouvelles séries de BSNS afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre la nature du transcrit de fusion et l'évolution clinique du patient.

Les principaux critères diagnostiques de cette nouvelle entité sont donc : tout d'abord sa localisation spécifique au niveau du tractus sinonasal, avec une prédominance au niveau de l'ethmoïde et des fosses nasales ; un aspect morphologique de sarcome à cellules fusiformes et monomorphes de bas grade ; un profil immunohistochimique particulier signant une double différenciation musculaire et nerveuse, caractérisé par la positivité de la PS100 et le plus souvent d'un marqueur musculaire tel que l'AML, le MyoD1 ou la desmine. Enfin, lorsque ce faisceau d'arguments ne suffit pas à affirmer le diagnostic de BSNS, en particulier sur microbiopsies, un réarrangement du gène PAX3 doit être recherché par FISH. En seconde intention, en cas de FISH ininterprétable, une analyse par RT-PCR à la recherche du transcrit de fusion le plus fréquent PAX3-MAML3 doit être envisagée.

D- BIBLIOGRAPHIE

1. Chan SW, Lim CJ, Guo K, Ng CP, Lee I, Hunziker W, et al. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 15 avr 2008;68(8):2592-8.
2. Szablewski V, Neuville A, Terrier P, Laé M, Schaub R, Garrel R, et al. Adult sinonasal soft tissue sarcoma: Analysis of 48 cases from the French Sarcoma Group database: Adult Sinonasal Soft Tissue Sarcoma. *The Laryngoscope.* mars 2015;125(3):615-23.
3. Wong WJ, Lauria A, Hornick JL, Xiao S, Fletcher JA, Marino-Enriquez A. Alternate *PAX 3 - FOXO 1* oncogenic fusion in biphenotypic sinonasal sarcoma: *PAX3-FOXO1* IN BIPHENOTYPIC SINONASAL SARCOMA. *Genes, Chromosomes and Cancer.* janv 2016;55(1):25-9.
4. Kakkar A, Rajeshwari M, Sakthivel P, Sharma MC, Sharma SC. Biphenotypic sinonasal sarcoma: A series of six cases with evaluation of role of β -catenin immunohistochemistry in differential diagnosis. *Ann Diagn Pathol.* avr 2018;33:6-10.
5. Rooper LM, Huang S-C, Antonescu CR, Westra WH, Bishop JA. Biphenotypic sinonasal sarcoma: an expanded immunoprofile including consistent nuclear β -catenin positivity and absence of SOX10 expression. *Human Pathology.* sept 2016;55:44-50.
6. Andreasen S, Bishop JA, Hellquist H, Hunt J, Kiss K, Rinaldo A, et al. Biphenotypic sinonasal sarcoma: demographics, clinicopathological characteristics, molecular features, and prognosis of a recently described entity. *Virchows Arch.* 14 août 2018;
7. Annavarapu SR, Cialfi S, Dominici C, Kokai GK, Uccini S, Ceccarelli S, et al. Characterization of Wnt/b-catenin signaling in rhabdomyosarcoma. *Laboratory Investigation.* 2013;93:10.
8. Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, Xiong QB, Barr FG. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol.* mai 1997;15(5):1831-6.

9. Edwards RH, Chatten J, Xiong QB, Barr FG. Detection of gene fusions in rhabdomyosarcoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of archival samples. *Diagn Mol Pathol.* avr 1997;6(2):91-7.
10. Kang Y, Pekmezci M, Folpe AL, Ersen A, Horvai AE. Diagnostic utility of SOX10 to distinguish malignant peripheral nerve sheath tumor from synovial sarcoma, including intraneural synovial sarcoma. *Mod Pathol.* janv 2014;27(1):55-61.
11. Belyea B, Kephart JG, Blum J, Kirsch DG, Linardic CM. Embryonic Signaling Pathways and Rhabdomyosarcoma: Contributions to Cancer Development and Opportunities for Therapeutic Targeting. *Sarcoma* [Internet]. 2012 [cité 31 août 2018];2012. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3350847/>
12. Avadhani V, Loftus PA, Meltzer D, Wang B, Tabaee A. Epithelioid Hemangioendothelioma of the Maxillary Sinus. *Head and Neck Pathology.* juin 2016;10(2):229-32.
13. Jo VY, Mariño-Enríquez A, Fletcher CDM, Hornick JL. Expression of PAX3 Distinguishes Biphenotypic Sinonasal Sarcoma From Histologic Mimics. *Am J Surg Pathol.* 31 mai 2018;
14. Tanas MR, Goldblum JR. Fluorescence In Situ Hybridization in the Diagnosis of Soft Tissue Neoplasms: A Review: Advances in Anatomic Pathology. nov 2009;16(6):383-91.
15. Fritchie KJ, Jin L, Wang X, Graham RP, Torbenson MS, Lewis JE, et al. Fusion gene profile of biphenotypic sinonasal sarcoma: an analysis of 44 cases. *Histopathology.* déc 2016;69(6):930-6.
16. Coindre J-M. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch Pathol Lab Med.* oct 2006;130(10):1448-53.
17. Cannon R, Wiggins R, Witt B, Dundar Y, Johnston T, Hunt J. Imaging and Outcomes for a New Entity: Low-Grade Sinonasal Sarcoma with Neural and Myogenic Features. *Journal of Neurological Surgery Reports.* 15 févr 2017;78(01):e15-9.

18. Coindre JM. Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology*. juill 2003;43(1):1-16.
19. Cleven AHG, Al Sannaa GA, Bruijn IB, Ingram DR, van de Rijn M, Rubin BP, et al. Loss of H3K27 tri-methylation is a diagnostic marker for Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors and an indicator for an inferior survival. *Mod Pathol*. juin 2016;29(6):582-90.
20. Schaefer I-M, Fletcher CD, Hornick JL. Loss of H3K27 trimethylation distinguishes malignant peripheral nerve sheath tumors from histologic mimics. *Mod Pathol*. janv 2016;29(1):4-13.
21. Le Guellec S, Macagno N, Velasco V, Lamant L, Lae M, Filleron T, et al. Loss of H3K27 trimethylation is not suitable for distinguishing malignant peripheral nerve sheath tumor from melanoma: a study of 387 cases including mimicking lesions. *Mod Pathol*. déc 2017;30(12):1677-87.
22. Hockstein NG, Dross PE, Farooqui S, Wilhelm IN. Low-grade sinonasal sarcoma with neural and myogenic features. *Ear Nose Throat J*. juin 2018;97(6):149-50.
23. Triki M, Ayadi L. Low-Grade Sinonasal Sarcoma With Neural and Myogenic Features. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141:4.
24. Powers KA, Han LM, Chiu AG, Aly FZ. Low-grade sinonasal sarcoma with neural and myogenic features—diagnostic challenge and pathogenic insight. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. mai 2015;119(5):e265-9.
25. Lewis JT, Schembri-Wismayer D, Moore EA, Garcia JG, Lonzo ML. Low-grade Sinonasal Sarcoma With Neural and Myogenic Features: A Clinicopathologic Analysis of 28 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(4):9.
26. Le Guellec S, Decouvelaere A-V, Filleron T, Valo I, Charon-Barra C, Robin Y-M, et al. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Is a Challenging Diagnosis: A Systematic Pathology Review, Immunohistochemistry, and Molecular Analysis in 160 Patients From the French Sarcoma Group Database. *The American Journal of Surgical*

Pathology. juill 2016;40(7):896-908.

27. Binh MBN, Sastre-Garau X, Guillou L, de Pinieux G, Terrier P, Lagacé R, et al. MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. *Am J Surg Pathol.* oct 2005;29(10):1340-7.

28. Coindre J-M. [Molecular biology of soft-tissue sarcomas]. *Bull Cancer.* nov 2010;97(11):1337-45.

29. Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, Hamada H, Hayashi H, Ono K, et al. Multivariate analysis for clinical prognostic factors in 163 patients with soft tissue sarcoma. *Cancer.* 1 oct 1988;62(7):1444-50.

30. Thompson LDR, Franchi A. New tumor entities in the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumors: Nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. *Virchows Archiv.* mars 2018;472(3):315-30.

31. Bishop JA. Newly Described Tumor Entities in Sinonasal Tract Pathology. *Head and Neck Pathology.* mars 2016;10(1):23-31.

32. Huang S-C, Ghossein RA, Bishop JA, Zhang L, Chen T-C, Huang H-Y, et al. Novel PAX3-NCOA1 Fusions in Biphenotypic Sinonasal Sarcoma With Focal Rhabdomyoblastic Differentiation: The American Journal of Surgical Pathology. *janv* 2016;40(1):51-9.

33. Jo VY, Fletcher CDM. Nuclear β -Catenin Expression is Frequent in Sinonasal Hemangiopericytoma and Its Mimics. *Head and Neck Pathology.* juin 2017;11(2):119-23.

34. Monsoro-Burq AH. PAX transcription factors in neural crest development. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* août 2015;44:87-96.

35. Buckingham M, Relaix F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* août 2015;44:115-25.

36. Yoshida H, Miyachi M, Sakamoto K, Ouchi K, Yagyu S, Kikuchi K, et al.

PAX3-NCOA2 fusion gene has a dual role in promoting the proliferation and inhibiting the myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene*. déc 2014;33(49):5601-8.

37. Kraus DH, Dubner S, Harrison LB, Strong EW, Hajdu SI, Kher U, et al. Prognostic factors for recurrence and survival in head and neck soft tissue sarcomas. *Cancer*. 15 juill 1994;74(2):697-702.

38. Rubin BP, Cooper K, Fletcher CDM, Folpe AL, Gannon FH, Hunt JL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with tumors of soft tissue. *Arch Pathol Lab Med*. avr 2010;134(4):e31-39.

39. Wenig BM. Recently Described Sinonasal Tract Lesions/Neoplasms: Considerations for the New World Health Organization Book. *Head and Neck Pathology*. mars 2014;8(1):33-41.

40. Fudaba H, Momii Y, Hirano T, Yamamoto H, Fujiki M. Recurrence of Biphenotypic Sinonasal Sarcoma With Cerebral Hemorrhaging. *J Craniofac Surg*. 13 juill 2018;

41. Sumegi J, Streblov R, Frayer RW, Cin PD, Rosenberg A, Meloni-Ehrig A, et al. Recurrent (2;2) and (2;8) Translocations in Rhabdomyosarcoma without the Canonical PAX-FOXO1 fuse PAX3 to Members of the Nuclear Receptor Transcriptional Coactivator (NCOA) Family. *Genes Chromosomes Cancer*. mars 2010;49(3):224-36.

42. Mosquera JM, Sboner A, Zhang L, Kitabayashi N, Chen C-L, Sung YS, et al. Recurrent *NCOA2* gene rearrangements in congenital/infantile spindle cell rhabdomyosarcoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*. juin 2013;52(6):538-50.

43. Wang X, Bledsoe KL, Graham RP, Asmann YW, Viswanatha DS, Lewis JE, et al. Recurrent PAX3-MAML3 fusion in biphenotypic sinonasal sarcoma. *Nature Genetics*. juill 2014;46(7):666-8.

44. Sumegi J, Streblov R, Frayer RW, Cin PD, Rosenberg A, Meloni-Ehrig A, et al. Recurrent t(2;2) and t(2;8) translocations in rhabdomyosarcoma without the canonical *PAX-FOXO1* fuse *PAX3* to members of the nuclear receptor transcriptional

coactivator family. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2009;NA-NA.

45. Zhou X, Lei Q-Y. Regulation of TAZ in cancer. *Protein & Cell*. août 2016;7(8):548-61.

46. Debled M, Ravaud A, Stöckle E, Nguyen BB. [Role of adjuvant chemotherapy in the treatment of soft tissue sarcoma]. *Bull Cancer*. juin 1997;84(6):653-63.

47. Bui NB, Coindre JM, Chauvergne J, Maree D, Denepoux R, Mage P. [Role of chemotherapy in the treatment of soft tissue sarcoma in adults]. *J Chir (Paris)*. janv 1986;123(1):53-8.

48. Mito JK, Qian X, Doyle LA, Hornick JL, Jo VY. Role of Histone H3K27 Trimethylation Loss as a Marker for Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor in Fine-Needle Aspiration and Small Biopsy Specimens. *Am J Clin Pathol*. 1 août 2017;148(2):179-89.

49. Kauke M, Safi A-F, Grandoch A, Nickenig H-J, Zöller J, Kreppel M. Sarcomas of the sinonasal tract. *Head Neck*. juin 2018;40(6):1279-86.

50. Pekmezci M, Cuevas-Ocampo AK, Perry A, Horvai AE. Significance of H3K27me3 loss in the diagnosis of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Mod Pathol*. déc 2017;30(12):1710-9.

51. Agaimy A, Haller F, Hartmann A. [Sinonasal tumors : News from the WHO with special reference to mesenchymal entities]. *Pathologe*. févr 2018;39(1):18-26.

52. Casali PG, Abecassis N, Bauer S, Biagini R, Bielack S, Bonvalot S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 28 mai 2018;

53. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 4 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217954>

54. Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 4 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20555081>

55. Johncilla M, Jo VY. Soft tissue tumors of the sinonasal tract. *Seminars in Diagnostic Pathology*. mars 2016;33(2):81-90.
56. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer*. 15 janv 1984;33(1):37-42.
57. Boudjadi S, Chatterjee B, Sun W, Vemu P, Barr FG. The expression and function of PAX3 in development and disease. *Gene*. août 2018;666:145-57.
58. Murakami M, Tominaga J, Makita R, Uchijima Y, Kurihara Y, Nakagawa O, et al. Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ. *Biochem Biophys Res Commun*. 13 janv 2006;339(2):533-9.
59. Gore MR. Treatment, outcomes, and demographics in sinonasal sarcoma: a systematic review of the literature. *BMC Ear Nose Throat Disord*. 2018;18:4.
60. Wachtel M, Schäfer BW. Unpeaceful roles of mutant PAX proteins in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. août 2015;44:126-34.
61. Stelow EB, Bishop JA. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Nasal Cavity, Paranasal Sinuses and Skull Base. *Head and Neck Pathology*. mars 2017;11(1):3-15.
62. El Demellawy D, McGowan-Jordan J, de Nanassy J, Chernetsova E, Nasr A. Update on molecular findings in rhabdomyosarcoma. *Pathology*. avr 2017;49(3):238-46.
63. Jo VY, Fletcher CDM. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*. févr 2014;46(2):95-104.
64. JM. Coindre, F. Collin, AV. Decouvelaere, D. Ranchère-Vince, N. de Saint-Aubain, A. Neuville. Enseignement Post-Universitaire : Tumeurs des Tissus mous. Paris, 2015.
65. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. World Health Organization. IARC Press: Lyon 2013.

66. Ge H, Liu K, Juan T, et al. FusionMap : detecting fusion genes from next-generation sequencing data at base-pair resolution. *Bioinformatics* 2011; 27:1922-8.
67. Benelli M, Pescucci C et al. Discovering chimeric transcripts in paired-end RNA-seq data by using EricScript, *Bioinformatics*. 2012; 28:3232-3239.
68. Hostein I, Andraud-Fregeville M, Guillou L et al. Rhabdomyosarcoma: value of myogenin expression analysis and molecular testing in diagnosing the alveolar subtype. An analysis of 109 paraffin-embedded specimen. *Cancer* 2004;101:2817-24.
69. Sun C, De Mello V, Mohamed A et al. Common and distinctive functions of the Hippo effectors Taz and Yap in skeletal muscle stem cell function. *Stem Cells* 2017; 35:1958-72.

E- ANNEXES

Protocole détaillé de l'analyse par FISH :

Des lames blanches de 4 µm ont été coupées à partir des blocs de paraffine, et déparaffinées par immersion dans trois bains successifs de Xylène de 10 min. Elles ont été réhydratées par des bains successifs dans des solutions d'éthanol de concentration décroissante (100%, 90% puis 70%) et rincées dans du tampon de lavage. Elles ont été prétraitées avec la solution de prétraitement du kit Dako, chauffée à 97°C pendant 10 minutes, et laissées à refroidir à température ambiante. Une zone riche en cellules tumorales a été préalablement sélectionnée et cerclée sur l'HES correspondant. Les lames ont été déposées dans l'Hybridizer (Dako, Danemark) chauffé à 37°C, et cinq gouttes de pepsine ont été déposées dans la zone cerclée pendant 7 minutes exactement. Les lames ont été rincées dans deux bains de tampon de lavage, puis déshydratées et séchées à l'air libre. Dix microlitres de la sonde ont été déposés sur chaque lame de chaque série au niveau de la zone cerclée, à l'abri de la lumière, puis couverts par une lamelle de 22 x 22 mm scellée avec une colle Ruber-ciment. Les lames ont ensuite été dénaturées dans l'Hybridizer humidifié pendant 5 min à 82°C et incubées dans l'étude à 37°C pendant la nuit. Le jour suivant, les lamelles ont été décollées. Les lames ont été déposées dans une solution de tampon stringeant froide, à l'abri de la lumière, puis chauffées pendant 10 min à 65°C, en agitant manuellement de temps en temps. Elles ont été rincées, déshydratées dans trois bains d'éthanol de concentration croissante, et séchées à l'air et à l'obscurité. Vingt-cinq microlitres de solution DAPI/antifade ont été pipetés sur chaque lame pour contre-colorer les noyaux et prolonger la durée d'interprétabilité. Une grande lamelle de 24 x 50 mm a été montée sur chaque lame, sans bulle d'air captive. Elles ont été stockées dans un plateau à 4°C pendant la nuit et lues le lendemain. Les signaux fluorescents jaunes, verts et orange ont été comptés dans les noyaux tumoraux avec un microscope fluorescent Nikon Eclipse 80i en utilisant les filtres appropriés. Les images ont été capturées avec la caméra Hamamatsu C4742-95 CCD et analysées avec le software Genikon (Alphelys, Plaisir, France). Pour chaque cas, cent noyaux ont été évalués. Les cas ont été considérés positifs si les signaux orange et verts étaient séparés par une distance supérieure à la taille de deux signaux dans plus de 10% des noyaux.

F- ARTICLE SOUMIS (Décembre 2018, The American Journal of Surgical Pathology)

This is a non-final version of an article published in final form in The American Journal of Surgical Pathology

Clinicopathological and molecular features of a series of 41 biphenotypic sinonasal sarcoma expanding their molecular spectrum, Le Loarer F^{1,2,3*}, Laffont S^{1*}, Lesluyes T^{2,3,4}, Tirode F^{5,6}, Antonescu C⁷, Baglin AC⁸, Delespaul L^{2,3,4}, Soubeyran I^{1,3}, Hostein I¹, Pérot G¹, Chibon F^{3,4}, Baud J³, Le Guellec S⁹, Karanian M^{5,6,10}, Costes-Martineau V¹¹, Castain C¹², Eimer S¹², Le Bail B^{2,12}, Wassef M^{8¶}, Coindre JM^{1,2,3¶}

Authors' names and degrees

François Le Loarer, MD, PhD, Sophie Laffont, MD, Tom Lesluyes, MSc, Franck Tirode, PhD, Cristina Antonescu, MD, Anne-Catherine Baglin, MD, Lucile Delespaul, MSc, Isabelle Hostein, PhD, Isabelle Soubeyran, MD, PhD, Gaëlle Pérot, PhD, Frédéric Chibon, PhD, Jessica Baud, PhD, Sophie Le Guellec, MD, Marie Karanian, MD, Valérie Costes-Martineau, MD, Claire Castain, MD, Sandrine Eimer, MD, Brigitte Le Bail, MD, Michel Wassef, MD, Jean-Michel Coindre, MD

Authors' Affiliations

¹ Department of Pathology, Institut Bergonie, Bordeaux, France.

² Université de Bordeaux, Talence, France.

³ INSERM U1218 ACTION, Bordeaux, France

⁴ Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France.

⁵ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France

⁶ Department of Translational Research and Innovation, Centre Leon Berard, Lyon, France

⁷ Department of Pathology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA

⁸ Department of Pathology, Hôpital Lariboisiere, Paris, France

⁹ Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer Toulouse-Oncopole, Toulouse, France.

¹⁰ Department of Pathology, Centre Leon Berard, Lyon, France.

¹¹ Department of Pathology, CHU de Montpellier, Montpellier, France

¹² Department of Pathology, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

Correspondence

Pr Jean-Michel Coindre

Phone: +33 556 33 33 29

Fax: +33 556 33 04 38

Email: j.coindre@bordeaux.unicancer.fr

*These authors contributed equally: François Le Loarer, Sophie Laffont

¶These authors jointly supervised the work: Michel Wassef, Jean-Michel Coindre

Running title: Biphenotypic sinonasal sarcoma

Abstract

Biphenotypic sinonasal sarcoma (BSNS) is a locally aggressive tumor occurring in the sinonasal region. It harbors both myogenic and neural differentiation and is characterized by *PAX3* rearrangement with *MAML3* as the most frequent fusion partner, but the partner of *PAX3* remains unidentified in a subset of cases. About 70 cases have been reported so far. In this study, we report a series of 41 cases with clinical, pathological and molecular description. Twenty-five (61%) patients were female and median age was 49 years. Tumors arose predominantly in the nasal cavity and ethmoidal sinuses. Local recurrences occurred in 8 cases out of the 25 (32%). Histological features were characteristic of BSNS with 5 cases showing focal rhabdomyoblastic differentiation. Immunohistochemistry showed a constant positivity of S100 protein and *PAX3* and negativity of *SOX10*. *MyoD1* was focally positive in 91% of cases whereas only 20% were positive for myogenin. Molecular analysis showed a *PAX3-MAML3* transcript in 37 cases (90%). RNA sequencing was performed in the 4 negative cases for *PAX3-MAML3* fusion and showed that one case harbored a *PAX3-FOXO1* fusion as previously described in the literature and two novel fusions: *PAX3-WWTR1* fusion in 2 cases and *PAX3-NCOA2* fusion in one case. RNA sequencing results were confirmed by FISH, RT-PCR and Sanger sequencing. The *PAX3-NCOA2*-positive case showed focal rhabdomyoblastic differentiation. In conclusion, we report two novel fusions (*PAX3-WWTR1* and *PAX3-NCOA2*) in BSNS and show that *MyoD1* is more sensitive than myogenin for demonstrating myogenic differentiation in this tumor.

Key words

Biphenotypic sinonasal sarcoma, PAX3, MAML3, FOXO1, WWTR1, NCOA2.

Introduction

Biphenotypic sinonasal sarcoma (BSNS), also known as low-grade sinonasal sarcoma with neural and myogenic features, is a locally aggressive tumor occurring in the sinonasal region, first delineated at the morphological level by Lewis JT et al in 2012 (1). In 2014, these tumors were shown to harbor a recurrent *PAX3-MAML3* fusion (2). In 2016, Huang SC (3) and Wong WJ et al (4) reported respectively 2 cases with a *PAX3-NCOA1* and one case with a *PAX3-FOXO1* fusion. The same year, Fritchie KJ et al (5) reassessed the Mayo Clinic series initially studied by Lewis JT et al and Wang X et al. In this enlarged series of 44 SNS, they reported 24 cases with a *PAX3-MAML3* fusion, 3 with a *PAX3-FOXO1* fusion and one with a *PAX3-NCOA1* fusion, whereas 11 cases showed a *PAX3* rearrangement with no defined partner, one case showed a *MAML3* rearrangement with no defined partner and 4 were negative for *PAX3*, *MAML3*, *FOXO1*, *NCOA1* and *NCOA2* genes.

We investigated a retrospective and prospective series of 41 cases at clinical, histological, immunohistochemical and molecular levels. Our findings expand the molecular spectrum of these lesions with the description of two previously unreported fusion variants, *PAX3-NCOA2* and *PAX3-WWTR1*.

Materials and methods

Selection of cases

Ethics approval from the appropriate committees was obtained. All sarcoma cases are recorded in the national sarcoma pathology RREPS database, approved by the National Committee for Protection of Personal Data (CNIL, n°910390), in compliance with the ethics principles of the Helsinki Declaration.

Formalin-fixed paraffin-embedded specimens diagnosed between January 2000 and June 2018 were retrieved from the archives of the pathology departments involved in the French soft tissue (RRePS) and head and neck (REFCOR) pathology networks. Forty-four cases were identified but three cases were excluded as the available material was not suitable for molecular analysis. The following clinical data were collected: gender, age at diagnosis, location and size of tumor, initial treatment and follow-up. All cases were microscopically reviewed by two pathologists (SL, JMC).

Immunohistochemistry

The tissue slides were deparaffinized in xylene, hydrated in alcohol, and baked in a microwave (30 min in Trisbuffer, pH 9). Endogenous peroxidase was blocked. Staining was performed on the Benchmark ultra-automated stainer (Ventana) using diamino-benzidine as chromogen (Dako, Glostrup, Denmark). The following antibodies were used: Pankeratin AE1/AE3 (clone PCK26, pre-diluted; Ventana Media Systems, Tucson, AZ, USA); EMA (clone E29, pre-diluted; Ventana Media Systems, Tucson, Arizona, USA); S100 protein (clone poly Z311, dilution 1:500; Dako, Glostrup, Denmark); smooth muscle actin (clone 1A4, dilution 1:12000; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA); desmin (clone DE-R-11, pre-diluted; Ventana Media Systems, Tucson, Arizona USA); myogenin (clone LO 26, dilution 1:20; Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA); MyoD1 (clone EP212, pre-diluted; Cell Marque, Rocklin, CA, USA); CD34 (clone QBEnd10, pre-diluted; Ventana, Tucson, AZ, USA); beta-catenin (clone 14, pre-diluted; Cell Marque, Rocklin, CA, USA); SOX10 (clone EP268, dilution 1:100; BioSB, Santa Barbara, CA, USA); H3K27Me3 (clone C36B11, dilution 1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); PAX3 (clone 274212, dilution 1:100; RD Systems Europe, Lille, France). For myogenin, MyoD1, SOX10, H3K27me3 beta-catenin and PAX3, only a nuclear staining was considered as positive.

Fluorescence *In situ* Hybridization

FISH analyses on interphase nuclei from paraffin-embedded 4- μ m-thick sections were performed by applying custom probes using bacterial artificial chromosomes (BACs), flanking *PAX3*, *MAML3*, *NCOA1* genes according to the procedure previously described (3). FISH analysis for *FOXO1*, *NCOA2* and *WWTR1* was performed with 4- μ m sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissue and the Histology FISH Accessory Kit (Agilent K5799, Dako, Glostrup, Denmark) using commercially available break apart probes covering *FOXO1* (Zytovision, Zytolight spec Z-2208-200), *NCOA2* (Empire genomics, EG-NCOA2BA-20-ORGR) and *WWTR1* (Zytovision, Zytolight spec Z-2212-50).

RNA extraction for Real-Time RT-PCR and Paired-end RNA-sequencing

Total RNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue section using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) according to the manufacturers' recommendations. DNA was removed using RNase-free DNase set (Qiagen) followed by a second Trizol extraction. The yield of total RNA obtained was evaluated using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction analysis for *PAX3-MAML3*, *PAX3-FOXO1*, *PAX3-NCOA2* and *PAX3-WWTR1* fusion genes

Real-time RT-PCR, using Taqman technology according to the technique previously described by Hostein et al (6), was performed for *PAX3-MAML3* and *PAX3-FOXO1* fusion genes. For *PAX3-MAML3* gene fusion, the following primers and probe were used:

PAX3 forward primer: 5'-TTT CCA GCT ATA CAG ACA GCT TTG-3'

MAML3 reverse primer: 5'-TCC TTC CAA CTT CCT TTT CAC AGT-3'

Probe: 5'-FAM-AACCCCACCATTTGGCAATGGCCT-TAMRA-3'

For *PAX3-FOXO1* gene fusion, the following primers and probe were used:

PAX3 forward primer: 5'-TTG GCA ATG GCC TCT CAC C-3'

FOXO1 reverse primer: 5'-ATC CAC CAA GAA CTT TTT CCA G-3'

Probe: 5'-TET-CCCTAC ACA GCA AGT TCA TTC GTG TGC AG-TAMRA-3'

Conventional RT-PCR was performed for *PAX3-NCOA2* and *PAX3-WWTR1* fusion genes.

An aliquot of the RNA extracted from FFPE tissue was used to confirm the novel fusion transcripts identified. One microgram of total RNA was reverse-transcribed in cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Invitrogen, cat. No. 4374966). PCR was performed using the AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase kit (Applied Biosystems™, cat. No. 4311806) on 50 ng of cDNA with the following primers: *PAX3_FWD*: 5' GACCCTGTCACAGGCTAC 3' and *WWTR1_REV*: 5' TCTGCTGGCTCAGGGTACT 3' and for the reciprocal transcript:

WWTR1_FWD: 5'-CACACCAGTGCCTCAGAG-3' and

PAX3_REV: 5'-CGTGTTCAAAAGGATTTGAAACC-3'.

For *PAX3-NCOA2* validation, the following primers were used:

PAX3_FWD: 5' CTTTGTGCCTCCGTCGGG 3' and *NCOA2_REV*:

5'CTCGTGTCTGGGAAAAGCTG 3'. The Touchdown 60°C program was used (TD 60°C; two cycles at 60°C, followed by two cycles at 59°C, two cycles at 58°C, three cycles at 57°C, three cycles at 56°C, four cycles at 55°C, four cycles at 54°C, five cycles at 53°C, and finally 10 cycles at 52°C). PCR products were then purified using the Illustra ExoProStar™ PCR Purification Kit (GE Healthcare, cat. No. US77702), and sequencing reactions were performed with the Big Dye Terminator V1.1 Kit (Applied Biosystems, cat. No. 4337450). After purification with the Big Dye

XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, cat. No. 4376486), the samples were sequenced on a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Paired-end RNA sequencing

Four cases were studied by RNA sequencing with formalin-fixed paraffin-embedded material (cases 5, 8, 29 and 40). All samples had a percentage of RNA fragments above 200 nucleotides (DV200) above 13% upon Tape Station analysis using the Hs RNA Screen Tape (Agilent).

Libraries were prepared with 100 ng of total RNA using the TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina, San Diego, USA). Libraries were pooled by groups of 12 samples. Paired-end sequencing was performed using the NextSeq 500/550 High Output V2 kit (150 cycles) on an Illumina NextSeq 500 platform (Illumina, San Diego, CA).

Sequencing data (average of 65 million reads per sample) were aligned with STAR on GRCh 38 reference genome. The fusion transcripts were called with STAR-Fusion, FusionMap, FusionCatcher, ERICSCRIPT and TopHat-fusion and validated if present in the fusion list of at least two algorithms (7-11).

Results

Clinical features

A total of 41 cases were included in this study. Patient characteristics and clinical follow-up are presented in Table 1. Sixteen patients were male (39%) and 25 female (61%). The mean and median ages at diagnosis were 52.2 and 49 years, respectively (range 25-84). Tumors arose predominantly in the nasal cavity (28 cases, 68%), ethmoid sinuses (20 cases, 49%) with 11 cases in both the nasal cavity and ethmoid sinuses (27%). Seven cases (17%) arose in the facial sinuses NOS and 6 cases (15%) showed an extensive tumor with involvement of the sinuses and adjacent bones. Tumor size was known in 17 cases and ranged from 10 to 90 mm (median size 35 mm).

Treatment was known in 33 patients and consisted in surgery for 32, with radiotherapy in 9 patients, chemotherapy in 2 and radiotherapy and chemotherapy in 2 patients.

Clinical follow-up varied from 11 to 185 months (median 45 months) and was available for 25 patients of the cohort with 8 recent cases. Local recurrences occurred in 8 cases (32%) at 9 to 95 months of follow-up. No patient showed evidence of distant metastasis.

Pathological features (Figures 1 and 2)

Initial diagnosis was schwannoma (n=6), neurofibroma (n=1), MPNST (n=13, with rhabdomyoblastic differentiation in 5 cases), synovial sarcoma (n=1), fibrosarcoma (n=3) and low-grade sinonasal sarcoma (n=17). Out of 20 cases seen after 2014, 17 were properly classified by the initial pathologist. Final diagnosis of BSNS was based on histology and immunohistochemistry according to the original description (1). The histologic characteristics are highly reproducible and diagnosis is easy in most cases. Tumors were poorly circumscribed with infiltrative involvement of surrounding tissues, particularly sinonasal bones (19 out of 33 samples containing bone tissues). Twenty-five cases showed hyperplasia of the overlying respiratory epithelium with entrapment of benign glands in the tumor. The tumors consisted of hypercellular proliferation of monotonous spindle cells arranged in fascicles, often with a herringbone pattern. The cellularity was typically high with usually scanty collagen and focally myxoid changes in 7 cases. A hemangiopericytoma-like pattern was focally present in 33 cases. Tumor cells were uniform with a monotonous elongated hyperchromatic nucleus with fine granular chromatin and a small amount of cytoplasm with indistinct borders. Pleomorphic cells were visible focally in only one case (Figure 2). Cells with abundant eosinophilic cytoplasm in favor of rhabdomyoblastic differentiation were present in 5 cases (cases 5, 6, 7, 14 and 16). Mitotic activity was low in most cases (from 0 to 4 mitoses per 10 high power fields, median count 1), but 2 cases showed 9 and 12 mitoses per 10 high-power fields. Necrosis was always absent.

Immunohistochemical features (Figure 3)

Results are summarized in Table 2. All 41 cases (100%) showed focal (56%) or diffuse (44%) positivity for S100 protein whereas SOX10 was negative in all cases tested. H3K27me3 was retained in 33% of cases and partial loss in 67% of cases (median, 65% of positive tumor cells). Smooth muscle actin was positive in 90% of cases, desmin in 66%, myogenin in 20% and MyoD1 in 91%. Desmin, myogenin and MyoD1 were positive only focally. PAX3 was positive in 29 cases tested with 21

cases showing a diffuse positivity (strong positivity in 14 and weak in 7 cases) and 8 cases with a focal positivity (strong positivity in 2 cases and weak in 6 cases). Nuclear beta-catenin was focally positive in 26% of cases. Pankeratin AE1/AE3, EMA and CD34 were focally positive in 11, 11 and 10% of cases, respectively.

Molecular biological features

Initially, 44 cases were screened with RT-PCR for *PAX3-MAML3*: 35 cases were positive, 5 negative and 4 non-interpretable because of nucleic acid degradation. Then, 8 of these negative or non-interpretable cases were screened with FISH for probes for *PAX3*: 5 were positive and 3 non-interpretable. These 3 non-interpretable cases for RT-PCR and FISH were excluded from the study because of nucleic acid degradation. Among the 5 positive cases with FISH for *PAX3*, 2 were positive with FISH for *MAML3* (cases 9 and 15) and 3 were negative. These 3 negative cases (cases 5, 8 and 29) were also negative with FISH for *NCOA1* and *FOXO1*. These 3 cases as well as case 40 (recent case negative for initial RT-PCR) were analyzed by RNA sequencing. This revealed a fusion transcript which was confirmed by both RT-PCR and FISH: *PAX3-NCOA2* (case 5), *PAX3-WWTR1* (cases 8 and 29) and *PAX3-FOXO1* (case 40). Fusion transcripts *PAX3-NCOA2* and *PAX3-WWTR1* were also confirmed by Sanger sequencing (Figures 4 and 5). They were both in frame fusions involving *PAX3* exon 7 with *NCOA2* exon 12 and *PAX3* exon 8 with *WWTR1* exon 5, respectively.

Discussion

To our knowledge, three series of biphenotypic sinonasal sarcoma have been published with 44, 11 and 15 cases, respectively (5, 12, 13). We report here the second largest series with 41 cases. We confirm that this tumor is locally aggressive with frequent bone destruction and local recurrence but with no distant metastasis. It occurs in the nasal cavity and/or paranasal sinuses, predominantly in middle-aged females. Histologically, BSNS is a poorly circumscribed and hypercellular proliferation of monotonous spindle cells with a low mitotic rate and, frequently, entrapped hyperplastic surface epithelium. In our series, only one case showed focal pleomorphic cells, 2 cases showed some mitotic activity and focal myxoid changes were present in 7 cases. We also confirm previously published data on the immunohistochemical profile with constant positivity, at least focal, for S100 protein and negativity for SOX10, frequent positivity of muscle markers and usual negativity

for epithelial markers and CD34. As recently reported by Jo VY et al (13), all our tested tumors were PAX3-positive but with weak and/or focal positivity in about half of them. Regarding muscle markers, we found frequent focal positivity for MyoD1 (91% of cases) but a much lower rate of positivity for myogenin (20%). This is in agreement with the expression profiling reported by Wang X et al (2) in 8 cases of BSNS. In that study, MyoD1 was one of the top 150 overexpressed genes. However, they observed a focal expression of MyoD1 in only 4 out of 25 cases whereas we found positivity in 91% of our cases. This difference may be due to the different antibodies used in the studies (clone 5.8 A by Wang X et al and clone EP212 in our study). Unlike Rooper LM et al (12) who reported an almost constant nuclear positivity for beta-catenin, only 26% of our cases showed focal nuclear positivity. Therefore, other studies are necessary to evaluate the usefulness of this marker in BSNS.

A recurrent *PAX3-MAML3* fusion event is present in most BSNS with a few cases showing alternative fusion of *PAX3* with *NCOA1* and *FOXO1*. In their series of 44 cases, Fritchie KJ et al (5) reported 24 cases with a *PAX3-MAML3*, 3 cases with a *PAX3-FOXO1* and 1 case with a *PAX3-NCOA1* fusion gene, whereas 11 cases showed a *PAX3* rearrangement but with no rearrangement of *MAML3*, *FOXO1*, *NCOA1* and *NCOA2* genes. In the present study, 37 cases showed a *PAX3-MAML3* fusion, 2 cases a *PAX3-WWTR1* fusion, 1 case a *PAX3-FOXO1* fusion and 1 case a *PAX3-NCOA2* fusion. Given the structural and functional similarity of the *MAML3*, *FOXO1*, *NCOA1* and *NCOA2* proteins, the presence of a *PAX3-NCOA2* fusion transcript in BSNS was expected (5). Like the 2 cases of BSNS with a *NCOA1* rearrangement reported by Huang SC et al (3), our case with a *NCOA2* rearrangement showed focal rhabdomyoblastic differentiation. *PAX3-WWTR1* is a new fusion in BSNS. *WWTR1*, also known as TAZ, is a transcriptional co-activator with a PDZ binding motif. In mammals, *YAPI* and *WWTR1* are downstream effectors of the Hippo signaling pathway, which is an evolutionarily conserved network that plays a central role in regulating cell proliferation and cell fate to control organ growth and regeneration. The Hippo pathway controls gene expression by inhibiting the activity of *YAPI* and *WWTR1*. Hyperactivity of these two genes promotes uncontrolled cell proliferation, impairs differentiation, and is associated with cancer (14). A *WWTR1-CAMTA1* fusion has been shown in epithelioid hemangioendothelioma and is now a key diagnostic tool for this rare tumor (15). BSNS is a second example of the direct role of *WWTR1* in the

development of a cancer. Recently, Sun C et al (16) reported the important role of *YAP1* and *WWTR1* in skeletal muscle stem cell function. They showed that *YAP1* and *WWTR1* play a similar role in promoting myoblastic proliferation, and that during the later stage of myogenesis, *WWTR1* switches toward influencing satellite cell fate by promoting myogenic differentiation. *YAP1* and *WWTR1* have many common target genes, but *WWTR1* regulates some genes independently of *YAP1*, including myogenic genes such as *PAX7*, *MYF5* and *MYOD1*.

In conclusion, this is the second largest series of BSNS. We report two new fusion transcripts, *PAX3-NCOA2* and *PAX3-WWTR1*, and confirm the major value of immunohistochemistry for the diagnosis with constant positivity of S100 protein and PAX3 associated with negativity of SOX10. Moreover, we found that MyoD1 is more sensitive than myogenin for demonstrating myogenic differentiation in this tumor.

Acknowledgments

The authors are grateful to the pathologists who provided material and clinical follow-up: G Aillet (Nantes), E Ancelin-Malbreil (Mont de Marsan), C Bouvier (CHU Marseille), P Camparo (Amiens), E Cassagnau (CHU Nantes), Croue (CHU Angers), M Desrousseau (Biarritz), François (CHU Rouen), Gauchez (CHU Marseille), Jouannelle-Sulpicy (Fort de France Martinique), E Lavoine (Angers), Lhermitte (La Reunion), A Lobna (Sfax, Tunisia), N Macagno (CHU Marseille), Milin (CHU Poitiers), Poizat (Montpellier), P Reau (Bordeaux), C Sader Ghorra (Beyrouth, Lebanon), Savel (La Roche sur Yon), E Uro-Coste (CHU Toulouse), S Valmary (CHU Besançon), I Valo (Angers) and N Weingertner (CHU Strasbourg).

Disclosure/conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lewis JT, Oliveira AM, Nascimento AG, Schembri-Wismayer D, Moore EA, Olsen KD, et al. Low-grade sinonasal sarcoma with neural and myogenic features: a clinicopathologic analysis of 28 cases. *Am J Surg Pathol* 2012;36:517–25.
2. Wang X, Bledsoe KL, Graham RP, Asmann YW, Viswanatha DS, Lewis JE, et al. Recurrent PAX3-MAML3 fusion in biphenotypic sinonasal sarcoma. *Nat Genet* 2014;46:666–8.

3. Huang S-C, Ghossein RA, Bishop JA, Zhang L, Chen T-C, Huang H-Y, et al. Novel PAX3-NCOA1 fusions in biphenotypic sinonasal sarcoma with focal rhabdomyoblastic differentiation. *Am J Surg Pathol* 2016;40:51–9.
4. Wong WJ, Lauria A, Hornick JL, Xiao S, Fletcher JA, Marino-Enriquez A. Alternate PAX3-FOXO1 oncogenic fusion in biphenotypic sinonasal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2016;55:25–9.
5. Fritchie KJ, Jin L, Wang X, Graham RP, Torbenson MS, Lewis JE, et al. Fusion gene profile of biphenotypic sinonasal sarcoma: an analysis of 44 cases. *Histopathology* 2016;69:930–6.
6. Hostein I, Andraud-Fregeville M, Guillou L et al. Rhabdomyosarcoma: value of myogenin expression analysis and molecular testing in diagnosing the alveolar subtype. An analysis of 109 paraffin-embedded specimen. *Cancer* 2004;101:2817-24.
7. Ge H, Liu K, Juan T et al. FusionMap: detecting fusion genes from next-generation sequencing data at base-pair resolution. *Bioinformatics* 2011;27:1922-8.
8. Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*. 2012;7:562-578.
9. Lagstad S, Zhao S, Hoff AM, et al. chimeraviz: a tool for visualizing chimeric RNA. *Bioinformatics* 2017;33:2954-6.3.
10. Nicorici D. SM, Edgren H., Kangaspeska S., Murumagi A., Kallioniemi O., Virtanen S., Kilkku O. FusionCatcher - a tool for finding somatic fusion genes in paired-end RNA-sequencing data. *bioRxiv*. 2014.
11. Benelli M, Pescucci C, Marseglia G, et al. Discovering chimeric transcripts in paired-end RNA-seq data by using EricScript. *Bioinformatics*. 2012;28:3232-3239.
12. Rooper LM, Huang S-C, Antonescu CR, Westra WH, Bishop JA. Biphenotypic sinonasal sarcoma: an expanded immunoprofile including consistent nuclear β -catenin positivity and absence of SOX10 expression. *Hum Pathol* 2016;55:44–50.

13. Jo VY, Mariño-Enriquez A, Fletcher CDM, Hornick JL. Expression of PAX3 distinguishes biphenotypic sinonasal sarcoma from histologic mimics. *Am J Surg Pathol* 2018;42:1275-85.
14. Misra JR, Irvine KD. The Hippo signaling network and its biological functions. *Annu Rev Genet* 2018;52:3.1-3.23.
15. Errani C, Zhang L, Sung YS et al. A novel WWTR1-CAMTA1 gene fusion is a consistent abnormality in epithelioid hemangioendothelioma of different anatomic sites. *Gens Chromosomes Cancer* 2011;50:644-53.
16. Sun C, De Mello V, Mohamed A et al. Common and distinctive functions of the Hippo effectors Taz and Yap in skeletal muscle stem cell function. *Stem Cells* 2017;35:1958-72.

Figure and Table legends

Figure 1: Main histological features of biphenotypic sinonasal sarcoma. Tumor is poorly circumscribed (A) with frequent involvement of sinonasal bones (B). Hyperplasia of overlying respiratory epithelium with entrapment of benign glands by tumor cells is a typical feature (C). Tumor is composed of hypercellular proliferation of monomorphic spindle cells arranged in medium-to-long fascicles, often with a herringbone pattern (D). Hemangiopericytoma-like pattern is common (E). Tumor cells are uniform with monotonous spindle nucleus and low mitotic activity (F).

Figure 2: Rare morphologic patterns of biphenotypic sinonasal sarcoma. Myxoid changes may be focally present (A). Focal chronic inflammatory infiltrate is rare. One case (#5) showed a histiocytic infiltrate (B). Only one case (#19) showed focal nuclear atypia (C). Focal rhabdomyoblastic differentiation was present in 5 cases with large round or elongated cells with abundant eosinophilic cytoplasm (D) and focal cross-striation. Desmin (E) and myogenin were always positive in these areas.

Figure 3: Immunohistochemical profile of biphenotypic sinonasal sarcoma. S100 protein was always positive focally or diffusely (A) whereas SOX 10 was always negative (B). MyoD1 was positive in about 90% of cases (C). Myogenin was focally positive in only 20% of cases (D). PAX3 was positive in all tested cases, strongly and diffusely in about half of them (E) but weakly and/or focally in the other cases with a background in some cases (F).

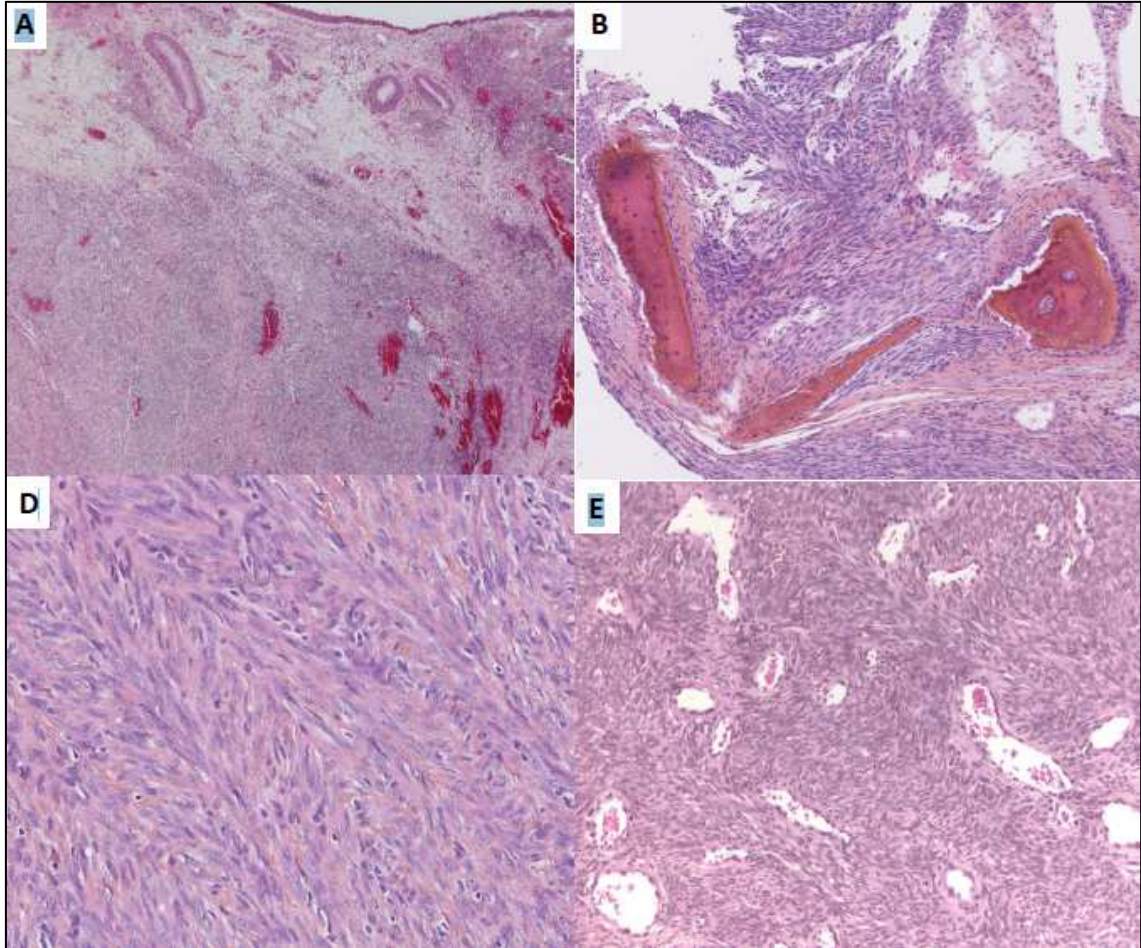
Figure 4: Novel *PAX3-NCOA2* fusion in biphenotypic sinonasal sarcoma (Case 5). Typical aspect of BSNS (A) with areas showing rhabdomyoblastic differentiation (B). Immunohistochemistry with desmin highlights cross-striations (C). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a break-apart probe shows a rearrangement of *NCOA2* (D). E. Structure of *PAX3-NCOA2* fusion transcript. From up to bottom: schematic representing locus and chromosomal positions of *PAX3* and *NCOA2*; schematic of breakpoint positions involving *PAX3* exon 7 and *NCOA2* exon 12; nucleotidic sequence of adjoined sequences.

Figure 5: Novel *PAX3-WWTR1* fusion in biphenotypic sinonasal sarcoma (Cases 8 and 29). Typical aspect of BSNS (A-case 8) with diffuse positivity of S100 protein (B-case 8). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a break-apart probe shows a rearrangement of *WWTR1* (C-case 29). D. From up to bottom: schematic representing locus and chromosomal positions of *PAX3* and *WWTR1*; schematic of breakpoint positions involving *PAX3* exon 8 and *WWTR1* exon 5 for both cases, and associated reciprocal fusion transcript *WWTR1* exon 4 and *PAX3* exon 10 for cases 29; nucleotidic sequence of adjoined sequences for cases 8 and 29.

Table 1: Clinical and follow-up data in a series of 41 biphenotypic sinonasal sarcomas.

Table 2: Immunohistochemical results in a series of 41 biphenotypic sinonasal sarcomas.

Figure 1



Suite Figure 1 :

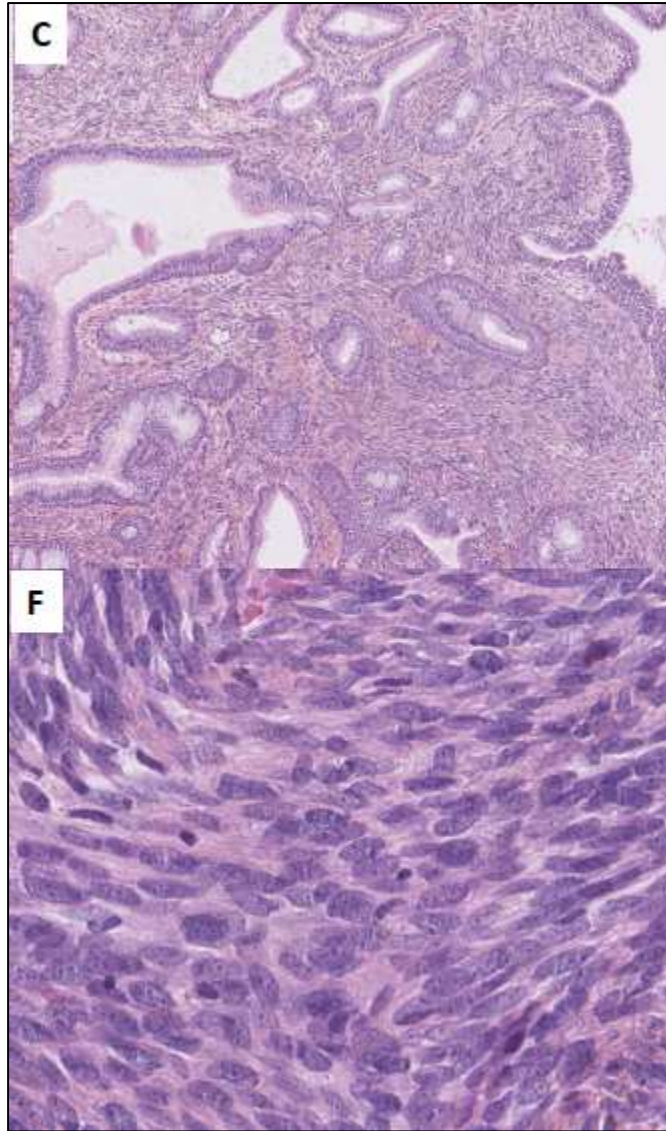
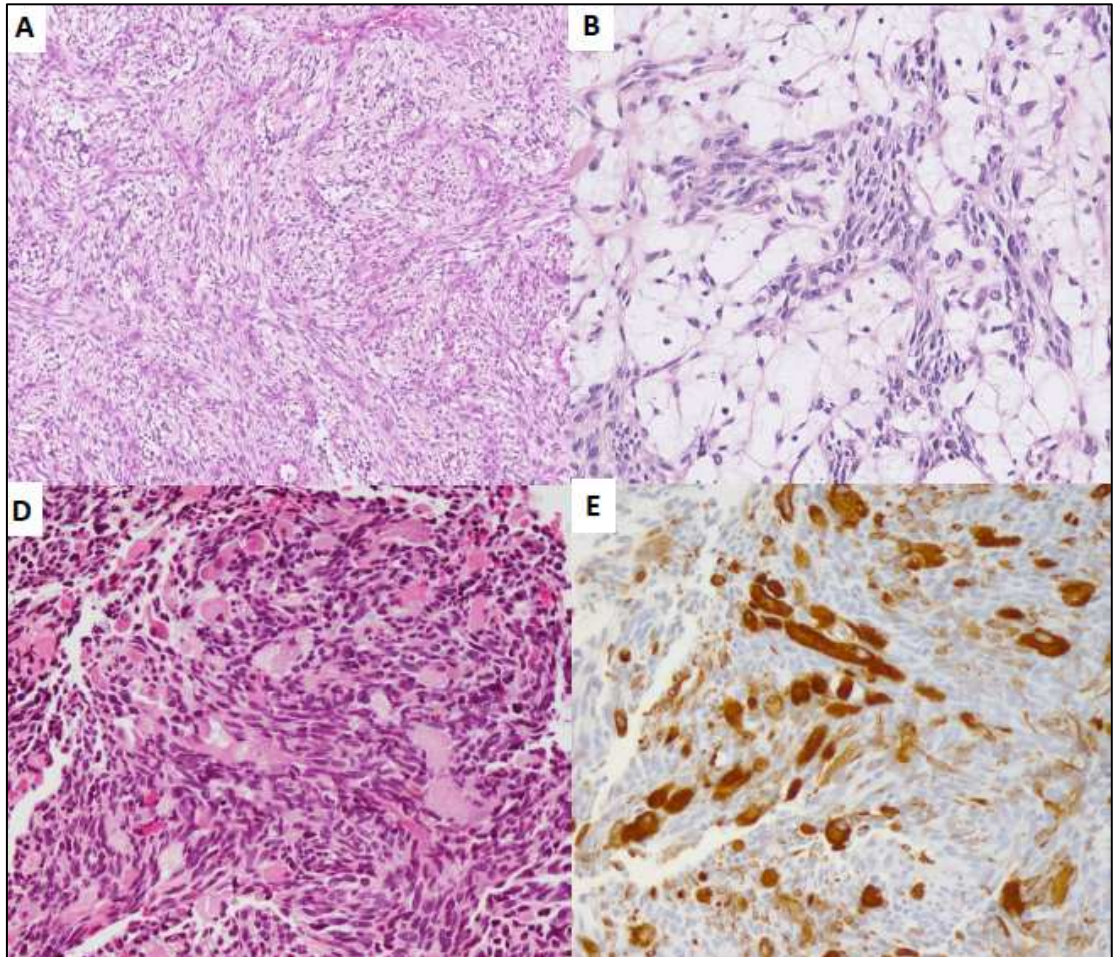


Figure 2



Suite Figure2 :

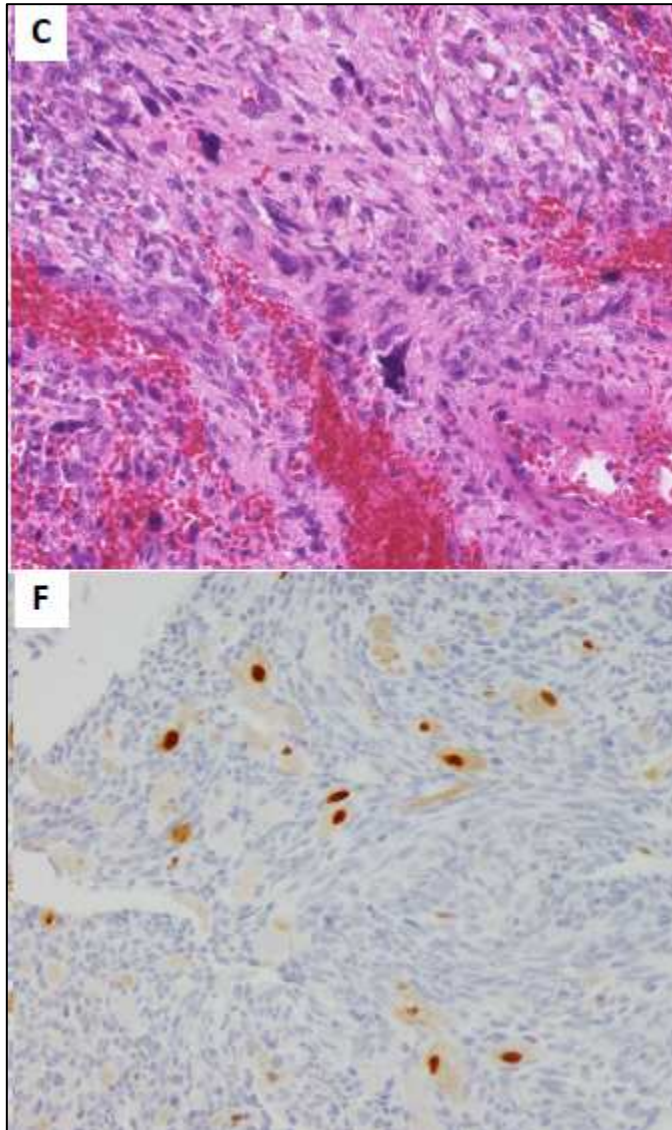
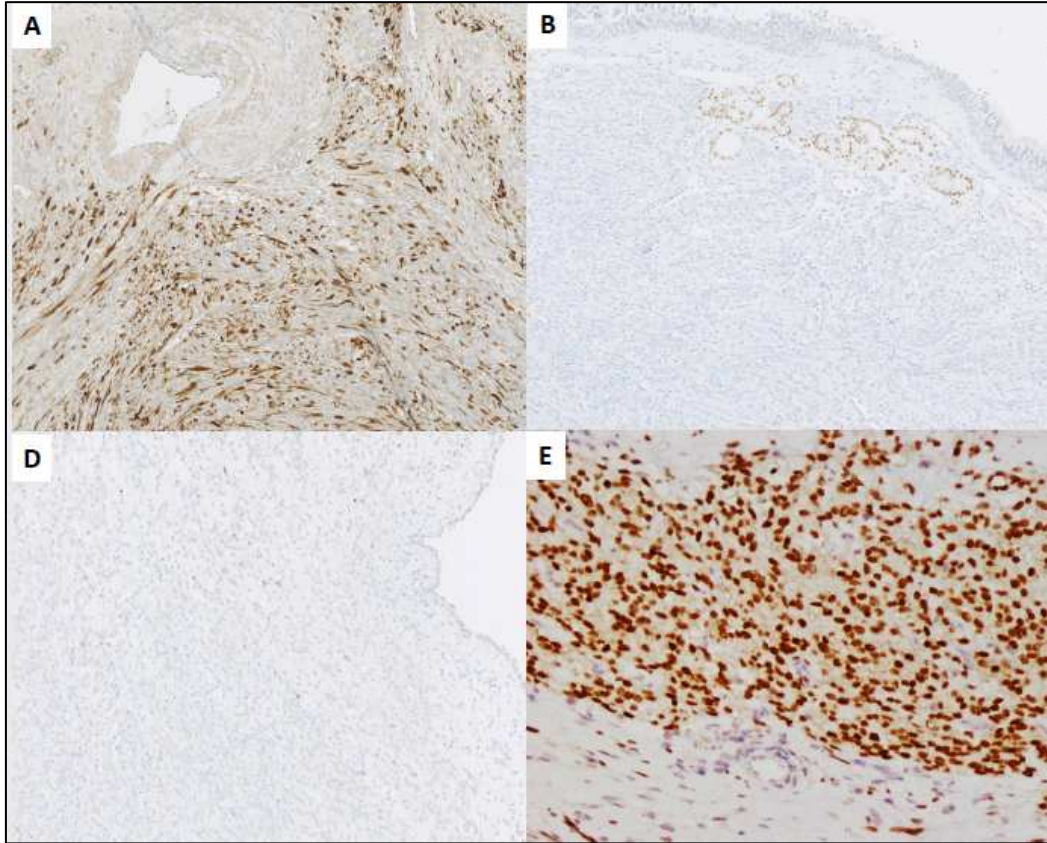


Figure 3 :



Suite Figure 3 :

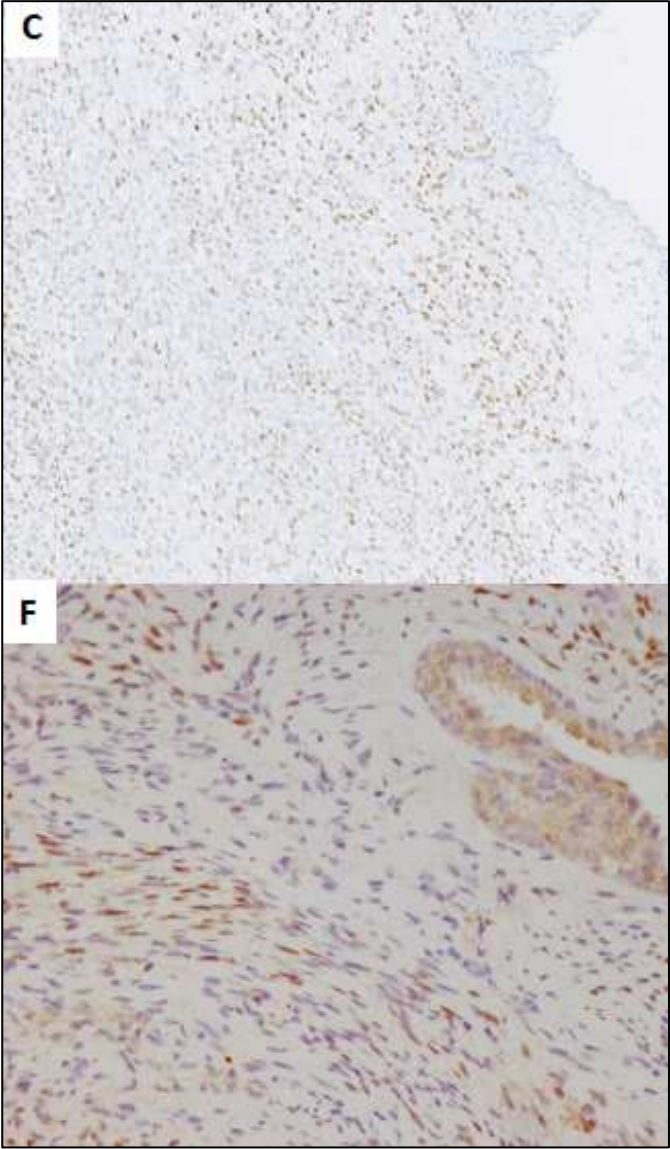


Figure 4 :

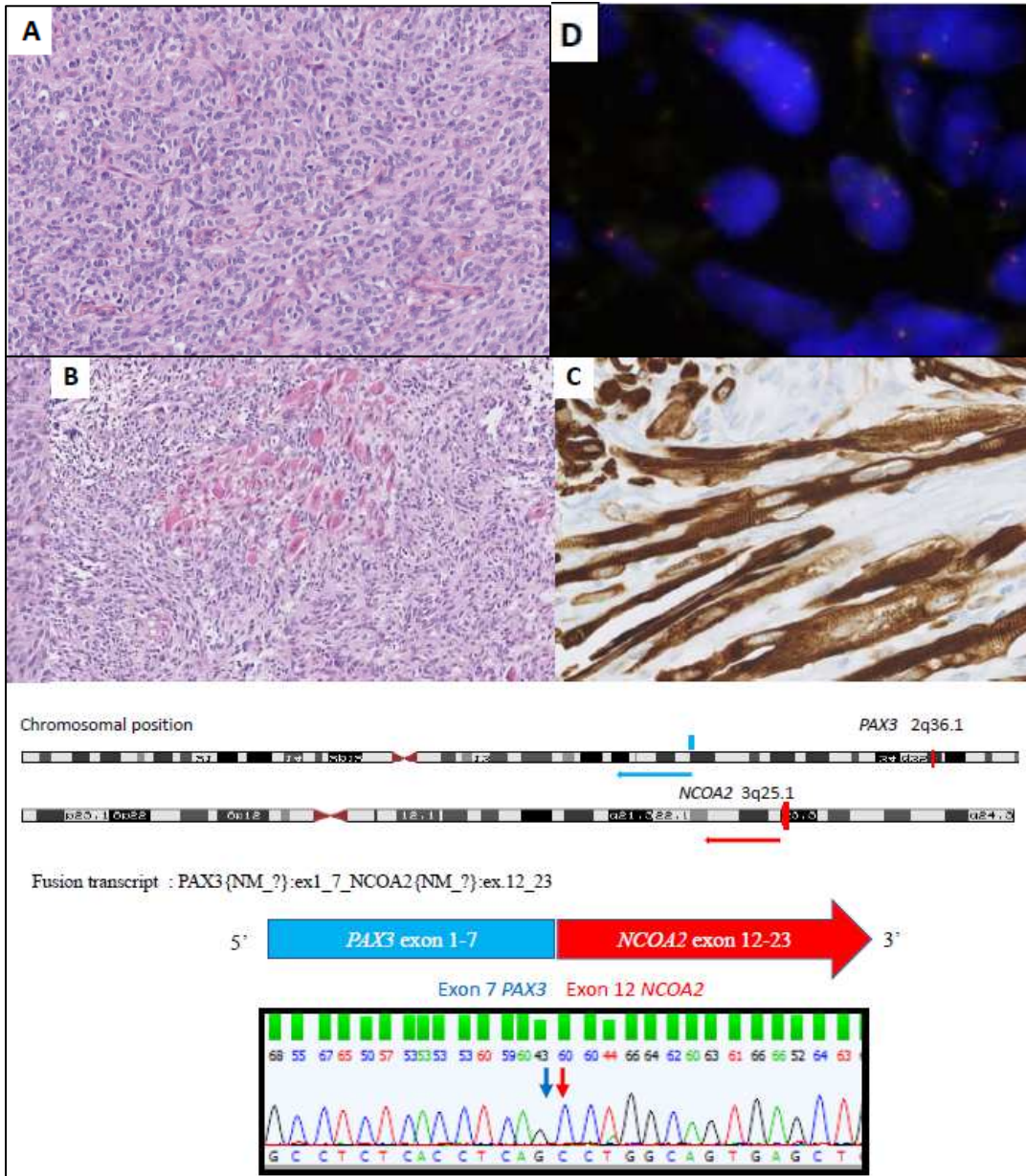


Figure 5 :

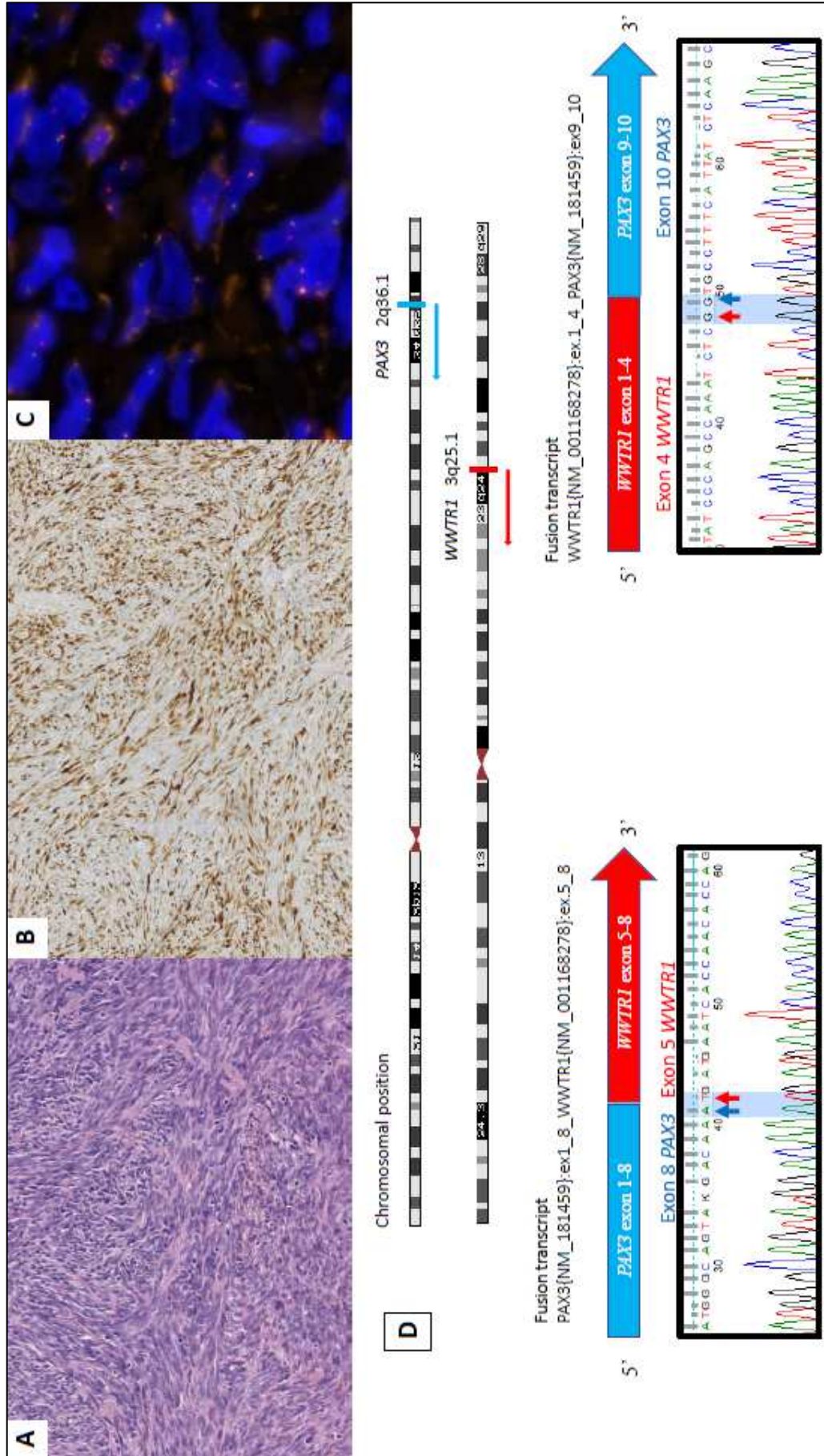


Table 1 :

Case	Sex	Age	Site of tumor
1	F	69	Sinus (ethmoid)
2	F	25	Nasal cavity
3	M	35	Nasal cavity
4	F	49	Sinus (ethmoid)
5	F	49	Nasal cavity/sinus (ethmoid)
6	F	40	Nasal cavity/sinus (ethmoid)/cribriform plate/skull base
7	F	38	Sinus (NOS)
8	M	76	Nasal cavity
9	F	63	Sinus (ethmoid)/skull base/orbit
10	F	37	Nasal cavity
11	M	63	Nasal cavity
12	F	43	Sinus (ethmoid)/skull base
13	M	28	Nasal cavity
14	F	62	Nasal cavity/sinus (ethmoid)
15	F	81	Nasal cavity/sinus (ethmoid)
16	F	25	Nasal cavity
17	M	28	Nasal cavity
18	M	38	Nasal cavity
19	M	50	Nasal cavity/sinus (ethmoid/frontal)
20	F	84	Sinus (ethmoid/frontal)/orbit
21	M	77	Nasal cavity/sinus (ethmoid/frontal)
22	F	71	Sinus (ethmoid/frontal)
23	F	77	Nasal cavity/sinus (ethmoid)/orbit/skull base
24	M	32	Nasal cavity/sinus (ethmoid/frontal)
25	M	59	Sinus (ethmoid/frontal)/orbit
26	M	65	Nasal cavity/sinus (ethmoid)
27	F	50	Nasal cavity
28	F	70	Nasal cavity
29	F	65	Nasal cavity
30	F	49	Sinus (NOS)
31	M	29	Sinus (ethmoid)
32	M	41	Nasal cavity/sinus (ethmoid)
33	F	64	Nasal cavity/sinus (NOS)
34	F	77	Nasal cavity/sinus (ethmoid)
35	M	38	Sinus (ethmoid)
36	F	41	Sinus (NOS)
37	F	60	Nasal cavity/sinus (NOS)
38	M	65	Nasal cavity/sinus (NOS)
39	F	31	Nasal cavity
40	M	39	Nasal cavity
41	F	48	Sinus (NOS)

Abbreviations: NA: not available; NED: no evolutive disease; AWD: alive

Treatment modalities	Local Recurrence (months)	Follow-up (months)	Status
Surgery	Yes (36m)	185	AWD
Surgery	No	175	NED
NA	NA	NA	NA
Surgery	No	145	NED
Chemotherapy, surgery, radiotherapy	No	83	NED
Surgery	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA
Surgery	No	119	NED
Chemotherapy, radiotherapy	Yes (91m)	102	AWD
Surgery, chemotherapy	No	107	NED
Radiotherapy, surgery	Yes (95m)	96	NED
Surgery, radiotherapy, chemotherapy	No	69	NED
Surgery	Yes (24m)	33	NED
Surgery, chemotherapy	No	55	NED
Surgery	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA
Surgery	Yes (27m)	34	NED
Surgery	No	54	NED
Surgery	Yes (15m)	49	NED
Surgery	No	45	NED
NA	NA	NA	NA
Surgery	No	23	NED
Surgery	No	17	NED
Surgery	No	27	NED
Surgery, radiotherapy	No	12	NED
Surgery, radiotherapy	Yes (11m)	23	NED
Surgery, radiotherapy	No	25	NED
Surgery	No	25	NED
Surgery	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA
Surgery, radiotherapy	No	20	NED
Surgery, radiotherapy	No	18	NED
Surgery	Yes (9m)	11	AWD
Surgery	NA	Recent case	NA
Surgery, radiotherapy	NA	Recent case	NA
NA	NA	Recent case	NA
NA	NA	Recent case	NA
NA	NA	Recent case	NA
NA	NA	Recent case	NA
NA	NA	Recent case	NA
NA	NA	Recent case	NA

Table 2 :

Antibody	Negativity (n)	Focal positivity (n)	Diffuse positivity (n)	Total positivity (%)
S100 protein	0	23	18	100
SOX10	34	0	0	0
H3K27me3	0	10	20	100
Desmin	14	27	0	66
MyoD1	3	32	0	91
Myogenin	33	8	0	20
Smooth Muscle Actin	4	28	7	90
PAX3	0	8	21	100
Beta catenin	16	5	1	27
AE1/AE3	34	4	0	11
EMA	32	4	0	11
CD34	36	4	0	10

CARACTERISATION CLINICO-PATHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DU SARCOMA SINONASAL BIPHENOTYPIQUE A PARTIR D'UNE SERIE DE 41 CAS

RESUME

OBJECTIFS

Le sarcome sinonasal biphénotypique (BSNS) est une tumeur rare de la région naso-sinusienne, de bas grade mais localement agressive, caractérisée par une double différenciation nerveuse et musculaire et, le plus souvent, par le transcrite de fusion PAX3-MAML3. L'objectif de notre étude était d'étendre la caractérisation de cette nouvelle entité, tout particulièrement au niveau moléculaire, à partir d'une analyse rétrospective et prospective d'une série de 41 cas.

MATERIELS ET METHODES

Les 41 cas de la série étaient issus des archives de plusieurs départements de Pathologie, membres des réseaux français spécialisés RRePS et REFCOR. Tous les cas ont fait l'objet d'une double relecture histologique. Les analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur un automate Benchmark Ultra (Roche Ventana, Meylan, France). Les analyses moléculaires ont été réalisées par FISH, RT-PCR et RNA-sequencing. Les données cliniques et de suivi ont également pu être analysées pour une partie des cas de la série.

RESULTATS

Dans cette étude, nous confirmons que le BSNS touche le plus souvent les femmes d'âge moyen et se développe majoritairement au niveau de la cavité nasale ou de l'ethmoïde. Il s'agit d'une tumeur localement agressive, fréquemment associée à un envahissement osseux de voisinage et à la survenue d'une récurrence locale. Au niveau microscopique, le BSNS se caractérise par une prolifération densément cellulaire, mal limitée, de cellules fusiformes et monomorphes, à l'activité mitotique faible. Le profil immunohistochimique est caractérisé par la positivité constante de la PS100, la négativité du SOX10 et une positivité fréquente des marqueurs musculaires et de PAX3. Enfin, au niveau moléculaire, nous avons identifié le transcrite de fusion canonique PAX3-MAML3 sur 37 cas ; le transcrite PAX3-FOXO1 sur 1 cas ; le transcrite PAX3-NCOA2 sur 1 cas et le transcrite PAX3-WWTR1 sur 2 cas.

CONCLUSION

Nous mettons ici en évidence deux nouveaux transcrits de fusion caractéristiques du BSNS, PAX3-NCOA2 et PAX3-WWTR1. Nous confirmons le rôle clé de l'immunohistochimie pour le diagnostic de cette tumeur, avec une positivité constante de la PS100 et de PAX3, associée à une négativité de SOX10. De plus, nous montrons que le MyoD1 est plus sensible que la myogénine pour mettre en évidence la différenciation musculaire striée du BSNS.

Discipline : Anatomie et cytologie pathologiques

Mots-clés : Sarcome sinonasal biphénotypique, PAX3, MAML3, FOXO1, WWTR1, NCOA2